

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-201704

(43)公開日 平成 6 年(1994) 7 月22日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/92	A	7055-2 J		
33/48	H	7055-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数10 (全 25 頁)

(21)出願番号	特願平5-255837	(71)出願人	391007079 マイルス・インコーポレーテッド MILES INCORPORATED アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、 エルクハート、ミルトル・ストリート 1127
(22)出願日	平成 5 年(1993)10月13日	(72)発明者	メリー・ベス・コザク アメリカ合衆国、インディアナ州、46561、 オスセオラ、ビートライス・ストリート 10324
(31)優先権主張番号	9 5 9 4 0 0	(72)発明者	アンドレア・パドク アメリカ合衆国、インディアナ州、46507、 ブリストル、シー・アール・2 18271
(32)優先日	1992年10月13日	(74)代理人	弁理士 津国 肇 (外 1 名)
(33)優先権主張国	米国 (U S)		

(54)【発明の名称】 HDL コレステロールに関する全血アッセイの改良型試験具および方法

(57)【要約】

【構成】 希釈されていない全血試料から、細胞性成分、低密度リポタンパク質および超低密度リポタンパク質を実質的に含まない血清または血漿を分離し、該血清または血漿中に存在する高密度リポタンパク質の予め決められた成分に関して該血清または血漿を試験するための方法および試験具。

【効果】 本発明の試験具および方法は、迅速、安全、経済的で、信頼性・再現性の高い、高密度リポタンパク質の予め決められた成分の検出・測定を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 希釈されていない全血試料から、細胞性成分、低密度リボタンパク質画分および超低密度リボタンパク質画分を分離する方法であって、

(a) 希釈されていない全血試料を、第一の担体マトリックスと接触させて該全血試料の細胞性成分を分離し、血清または血漿を得；

(b) 該血清または血漿を、第一の担体マトリックスとフルイドコミュニケーションの状態にあり、該血清または血漿から低密度リボタンパク質画分および超低密度リボタンパク質画分を分離するのに十分な量の多価金属イオンおよび十分な量の沈殿化合物を含む沈殿試薬組成物をその中に包含する第二の担体マトリックスへ移動させて、該血清または血漿から低密度リボタンパク質画分および超低密度リボタンパク質画分を分離し、高密度リボタンパク質画分を含有する血清または血漿を得；そして

(c) 該高密度リボタンパク質画分を含有する血清または血漿を、第二の担体マトリックスを通して流れ出させることを特徴とする方法。

【請求項2】 第二の担体マトリックスを通して流れ出る高密度リボタンパク質画分を含有する血清または血漿を処理して、高密度リボタンパク質画分の予め決められた成分の存在または濃度を測定することをさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】 希釈されていない全血試料から、細胞性成分、低密度リボタンパク質および超低密度リボタンパク質を実質的に含まない血清または血漿を分離し、該血清または血漿中に存在する高密度リボタンパク質の予め決められた成分に関して該血清または血漿を試験する方法であって、

(a) 希釈されていない全血試料を、第一の担体マトリックスと接触させて該全血試料の細胞性成分を分離した血清または血漿を得；

(b) 該血清または血漿を、第一の担体マトリックスとフルイドコミュニケーションの状態にあり、該血清または血漿から低密度リボタンパク質および超低密度リボタンパク質を分離するのに十分な量の多価金属イオンおよび十分な量の沈殿化合物とを含む沈殿試薬組成物をその中に包含する第二の担体マトリックスへ移動させて、該血清または血漿から低密度リボタンパク質および超低密度リボタンパク質を分離し、細胞性成分、低密度リボタンパク質および超低密度リボタンパク質を実質的に含まず、かつ高密度リボタンパク質を含有する血清または血漿を得；

(c) 該高密度リボタンパク質を含有する血清または血漿を、該血清または血漿中の高密度リボタンパク質の予め決められた成分を分析するための試薬組成物を包含する試験域と接触させ、ここで該試薬組成物は高密度リボタンパク質の予め決められた成分と相互作用して該試験域中に検出可能な変化を生じることができ；そして

(d) 該試験域を、検出可能な変化に関して検査することを特徴とする方法。

【請求項4】 第一の担体マトリックスが、シリカゲル、アルミナ、ケイ藻土、ろ紙、クロマトグラフィー紙、グラスファイバー、セルロースアセテート、セルロース系ビーズ、ポリ塩化ビニル、ポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリウレタン、架橋デキストラン、アガロース、ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリフッ化ビニリデン、ポリスルホン、およびそれらの混合物より成る群から選択される、請求項3記載の方法。

【請求項5】 第一の担体マトリックスが、約0.1 μ ~ 約50 μ の範囲の孔サイズを有する、請求項3記載の方法。

【請求項6】 液体試験試料中の高密度リボタンパク質成分に実質的に影響を与えずに、液体試験試料から、細胞性成分、低密度リボタンパク質成分および超低密度リボタンパク質成分を分離し、高密度リボタンパク質成分中の予め決められた成分の存在または濃度を測定する分析対象物試験具であって、該試験具が、

(a) 試験パッドを支持するための支持手段；

(b) 該支持手段に固定され、液体試験試料と接触すると、液体試験試料中の高密度リボタンパク質成分の予め決められた成分に応答して検出可能な変化を生じる試薬組成物を包含する基材物質を含む多孔性試験パッド；および

(c) 液体試験試料から、細胞性成分、低密度リボタンパク質成分および超低密度リボタンパク質成分を分離するための分離手段であって、(i) 液体試験試料から細胞性成分を分離するための第一の担体マトリックス手段、および(ii) 多価金属イオンおよび沈殿化合物を含む沈殿試薬組成物をその中に包含する第二の担体マトリックスを含む、液体試験試料から低密度リボタンパク質成分および超低密度リボタンパク質成分を分離するための第二の担体マトリックス手段を含み、ここで該第一の担体マトリックス手段は、該第二の担体マトリックス手段と接し、試験試料を受けるために適当な露出部分を有し；該第二の担体マトリックス手段は、該試験パッドとフルイドコミュニケーションの状態にある分離手段を含むことを特徴とする試験具。

【請求項7】 第一の担体マトリックス手段が、アグルチニン、凝固剤、およびそれらの混合物より成る群から選択される分離試薬を包含する、請求項6記載の分析対象物試験具。

【請求項8】 細胞性成分、低密度リボタンパク質および超低密度リボタンパク質を実質的に含まず、高密度リボタンパク質を含有する血清または血漿を生物学的液体から分離し、高密度リボタンパク質の予め決められた成分を検出するための試験具であって、

(a) 生物学的液体から細胞性成分を分離するための第

一の担体マトリックス；

(b) 該第一の担体マトリックスと接し、多価金属イオンおよび沈殿化合物を含む沈殿試薬組成物をその中に包含する、該生物学的液体から低密度リポタンパク質および超低密度リポタンパク質を分離して高密度リポタンパク質を含有する血清または血漿を生成するための第二の担体マトリックス；および

(c) 該第二の担体マトリックスとフルイドコミュニケーションの状態にあり、高密度リポタンパク質を含有する血清または血漿と接触すると、高密度リポタンパク質の予め決められた成分と相互作用して試験域中に検出可能な変化を生じるのに十分な量の試薬組成物を含有する試験域を含み、ここで該第一の担体マトリックスが、生物学的液体が最初に該第一の担体マトリックスと接触するように配置され、該試験域が、細胞性成分、低密度リポタンパク質成分および超低密度リポタンパク質成分から実質的に干渉を受けずに高密度リポタンパク質の予め決められた成分と該試薬組成物との相互作用が検出されるように配置されていることを特徴とする試験具。

【請求項9】 生物学的液体が、全血である請求項8記載の試験具。

【請求項10】 高密度リポタンパク質の予め決められた成分が、コレステロールである請求項8記載の試験具。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、a) 全血の細胞性成分を血漿または血清から分離し、b) 血漿または血清から低密度リポタンパク質(LDL)分画および超低密度リポタンパク質(VLDL)分画を分離し、そしてc) 次いで高密度リポタンパク質(HDL)分画に存在する、コレステロールのような予め決められた成分に関して血漿または血清をアッセイする、改良型試験具および方法に関する。より詳しくは、本発明は、全血の細胞性成分を血漿または血清から分離し、保持する第一のゾーンと、血漿または血清からLDL分画およびVLDL分画を分離する第二のゾーンとを含む分離域を有する試験具を用いて、全血試料から細胞性成分、LDL分画およびVLDL分画を分離する、改良された方法に関する。分離域を出る希釈されていない血漿または血清は、次いで該血漿または血清をコレステロールに関してアッセイするのに必要な試薬を含有する試験域に移動する。希釈されていない血漿または血清が試験域に接触した後、試験域を色変化のような応答に関して調べ、血漿または血清中に存在するHDLコレステロールに関して定量的アッセイを提供する。ひとつの態様においては、試験具は乾相試験ストリップであり、ここでは、1つ以上のフィルターパッドを含む分離域が試験パッドを含む試験域と接している。試験パッドの表面を応答に関して調べる。別の態様においては、分離域は試験域とフルイドコミュニ

ケーションの状態(液体が流通する状態)にあり、細胞を含まず、LDLを含まず、かつVLDLを含まない血漿または血清が、分離域から試験域へ、例えば毛細管作用を通じて移動し、試験試料中のコレステロールに関してHDL画分がアッセイされることになる。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】現在、予め決められた可溶性成分の存在または欠如に関して体液を簡便・迅速に分析するために、多数の試験具が利用可能である。例えば、尿中のグルコース、尿酸またはタンパク質の検出；および血中のグルコース、トリグリセリド類、カリウムイオンまたはコレステロールの検出のための試験が利用可能である。歴史的には、予め決められた可溶性成分に関する全血試料のアッセイは、設計が最も難しいものである。

【0003】全血の細胞性成分、特に赤血球は、全血の可溶性成分に関するアッセイにおいて主要な干渉物質である。最も簡便な血液試験は色原性であり、全血の予め決められた可溶性成分は特定の試薬と相互作用して、該成分の存在または欠如の定性的指標として特有の色の化合物を形成するか、または該成分の存在の定量的指標として変化する色強度の有色化合物を形成する。全血試料の深赤色はこれらの色原性試験に干渉し、そのため通常は、血液試料を予め決められた可溶性成分に関してアッセイする前に、高度に有色の赤血球を血漿または血清から分離する。

【0004】赤血球の存在はまた、種々の非色原性血液アッセイにも干渉することができ、それによりアッセイ結果は一貫性がなくなるか、または一貫性があっても不正確である。さらに、白血球を含むその他の細胞性成分も、標準的な色原性血液アッセイにおいて干渉し得る。そのため、全血の予め決められた可溶性成分に関して信頼できるアッセイを達成するためには、予め決められた可溶性成分に関して全血試料を分析する前に、全血の細胞性成分から血清または血漿を分離することが必須である。

【0005】興味のある予め決められた可溶性成分がコレステロールである場合、アッセイはさらに面倒になる。全ての細胞は成長にコレステロールを必要とするが、細胞によるコレステロールの過剰な蓄積は、動脈硬化症(atherosclerosis)を含む種々の疾患を引き起こし得る。そのため、総血清コレステロール量が動脈硬化症の発病と相関され得るので、コレステロールは重要な分析対象物である。したがって、血清または血漿中のコレステロールに関するアッセイは、臨床検査室において最も頻繁に実施される試験のひとつである。

【0006】コレステロールおよびコレステロールエステルは水不溶性物質であり、そのため、最終的に細胞によって利用されるために、循環系においてはリポタンパク質によって担持されている。リポタンパク質は複合粒

子であって、変化する量のタンパク質、リン脂質、コレステロールおよびトリグリセリド類を含有する。血清中のリポタンパク質はその密度によって分類される。これらの密度に基づくクラスとしては、超低密度リポタンパク質（VLDL）、低密度リポタンパク質（LDL）、および高密度リポタンパク質（HDL）が挙げられる。これらのリポタンパク質のクラスの各々は、変化する量のコレステロールを担持する。そして、総血清コレステロールアッセイは、血清の総リポタンパク質濃度に各リポタンパク質クラスが寄与する量の複合平均である。

【0007】特異的なリポタンパク質クラスであるLDL画分が細胞中のコレステロールの蓄積の原因であり、動脈硬化症を含む心臓病の進行により密接に関連していることは、よく知られている。したがって、血中のLDL画分の増加したレベルを早期に検出することは非常に重要である。これに対して、HDL画分は、細胞から過剰なコレステロールを除去することにおいて重要であることが示されている。したがって、動脈硬化症とHDLコレステロールレベルとの間には、ネガティブな相関が存在する。そのうえ、動脈硬化症と血中のLDLコレステロールレベルとの間の相関は、動脈硬化症と総血清コレステロールレベルとの間の同様の相関より高い。

【0008】高密度リポタンパク質（HDL）は、HDLコレステロールと心臓梗塞のリスクとの間の逆の関係により、広範な研究の焦点であった。結果として、血中のHDLコレステロールレベルが低ければ、個体は心臓梗塞の増加したリスクを有する。したがって、個体の動脈硬化症のリスクはHDLコレステロールに関するアッセイによって概算することができる。HDLコレステロールアッセイは、次いで、以下の式から強度に動脈硬化症誘発性のLDLコレステロールのおよその量を算出するのに用いられる：

【0009】 $\text{LDLコレステロール} = \text{総コレステロール} - 1/5 \text{総トリグリセリド類} \times \text{HDLコレステロール}$

【0010】HDL画分中のコレステロール含量を決めるためには、その他のリポタンパク質画分を試験試料から除去しなければならない。リポタンパク質画分を分離するために、4つの一般的方法が開発された。しかしながら、各々の方法に不利な点がある。例えば、超遠心法は一般的な方法であるが、この方法は特別な装置、敏感な操作技術および数日にわたり得る長い分離時間を必要とするため、ルーチンの実験室アッセイには不適當である。結果として、超遠心法は医学研究実験室に限られてきた。

【0011】別の方法においては、ヘパリンナトリウムまたは硫酸デキストランのようなポリ陰イオン、およびカルシウム、マンガンまたはマグネシウムのような二価陽イオンを用いる画分沈殿反応によって、LDL含量を測定する。この方法においては、ポリ陰イオンの濃度を増やすことによって、リポタンパク質画分をVLDL、

LDL、次いでHDLの順に沈殿させる。しかしながら、この方法は2つの操作工程を必要とする。なぜなら、最初にVLDL画分を第一の沈殿工程で分離し、次いでポリ陰イオンの濃度を増加させることによりLDL画分を沈殿させるからである。したがって、この方法は実用的ではなく、自動化しにくい。

【0012】第三の方法においては、LDLコレステロールをフリーデワルド式（Friedewald formula）から決定する。試料のトリグリセリドおよび総コレステロール濃度（HDLコレステロール含量を含む）を、試験試料からVLDL画分およびLDL画分を沈殿させることにより測定する。LDLコレステロールの量を、次いでフリーデワルド式から算出する。この方法もまた手間がかかり、実用的でない。第4の方法は、電気泳動的分離およびポリ陰イオン沈殿法であって、時間がかかり、LDLコレステロール濃度を測定するために電気泳動装置とデンストメーターを必要とする。したがって、上記の4つの方法のどれひとつとしてHDLコレステロールのルーチンアッセイに好適ではない。

【0013】HDL画分中のコレステロール量に関する全血試料のアッセイにおいては、全血の細胞性成分ならびに血漿または血清のLDL画分およびVLDL画分を、全血試料から分離する。従来的には、遠心分離によって全血の細胞性物質から血漿または血清を分離する。細胞性物質は遠心管の底に集まり、上清の血漿または血清をデカンテーションする。したがって、実質的なバックグラウンド干渉が回避されるように、全血の干渉性の細胞性成分が十分に除去される。上清の血漿または血清を、次いで血漿または血清からLDL画分およびVLDL画分を分離する上記の方法のいずれかに供する。

【0014】遠心分離法は、しかしながら通常約0.1 ml〜約5 mlの比較的多い血液試料を必要とし、そして約5〜10分の長い遠心時間を必要とするという主要な欠点を有する。さらに、遠心分離法はいくつかの操作工程を必要とする。結果として、実験者は、潜在的に感染性の血液試料と接触し得るか、または比較的多い血液試料で汚染された実験室装置と接触し得る。そして疾患と接触する。

【0015】全体として、上記の分離技術の全ては、多数の血液試料をアッセイする大きな実験室や、病院のようにアッセイ結果を何分かで必要としない機関に最も適している。しかしながら、多くの小さい実験室や個人の医療オフィスは、現場に遠心機、超遠心機、またはそのような他の血漿もしくは血清分離機を有していない。したがって、簡便な色原性試験を現場で迅速・安全・容易に実施することができず、全血試料は効率的で安全な分離およびアッセイのために外部の実験室へ送られる。結果として、アッセイ結果は、何分かではなく、何時間かまたは何日かで入手される。

【0016】したがって、研究者らは、血漿または血清

中の可溶性成分のアイデンティティおよび濃度が変化しないように、全血の干渉性の細胞性成分の実質的に全てを、速く、安全に、容易に血漿または血清から分離する試験具および方法を、模索し続けてきた。そのうえ、コレステロールアッセイについては、医師が今日の総血清コレステロールアッセイによって提供される推定よりも良い潜在的な心臓血管のリスクの推定を被験者に提供できるように、血漿または血清からLDL画分およびVLDL画分を分離する、簡便で安価な試験具および方法に対する必要性もまた存在する。研究者らは、血漿または血清から干渉性の細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分を分離するいくつかの試験具および方法を提供してきた。しかしながら、それぞれの方法および試験具は、血漿または血清のHDL画分中に存在するコレステロールに関して全血試料をアッセイすることにおいて、その方法または試験具を不正確、面倒または非実用的なものにするような、少なくとも1つの欠点を有していた。

【0017】遠心分離以外の方法が、少量の全血試料の細胞性成分を血清または血漿から分離するのに用いられてきた。簡便な方法のうちのひとつは、Adams et al.によって米国特許第3,092,465号において開示されたものであり、これは、色原性試験試薬で含浸し、半透明のバリアでコートされた、吸水性または吸湿性のマトリックスを用いた。半透明バリアは、全血試料の細胞性成分を遮断し、小さい可溶性成分およびイオンの通過を許して、吸水性マトリックスに包含されている色原性試験試薬と接触させる。陽性試験の場合には、実質的に無色の血漿または血清は、色原性試験試薬と相互作用して吸水性マトリックス内に色を生成する。この色は、半透明バリアに保持されている細胞性物質を、試験具からすすぎ落とすか拭きとることによって観察される。しかしながら、すすぎや拭きとり技術は面倒で手間がかかり、半透明バリアから赤血球が完全に拭き取られるかすすぎ落とされていないと、アッセイ干渉が起こり得る。その上、実験者が潜在的に感染性の血液試料と接触する可能性は高い。Mastは、米国特許第3,298,789号において同様の試験具を開示した。ここでは、エチルセルロースのフィルムが半透明バリアとして用いられている。Sodicksonは、米国特許第4,059,405号において、限外ろ過膜を用いて、血漿または血清からの細胞性成分の分離を達成した。

【0018】Fetterの米国特許第3,552,925号および第3,552,928号は、可溶性成分に関して全血試料をアッセイするための別の方法および試験具を開示した。Fetterは、第一の領域が非揮発性の無機塩またはアミノ酸で含浸され、隣接するマトリックスの第二の領域が試験試薬で含浸されている吸水性マトリックスを有する試験具を記載した。全血試料は、無機塩またはアミノ酸を含有する吸水性マトリックスの第一の領域と

最初に接触するように、吸水性マトリックス上に導入される。この塩またはアミノ酸は血液の細胞性成分を沈殿させ、血漿または血清は、次いで、試験試薬と色原性相互作用するために、試験試薬が含浸された吸水性マトリックスの第二の領域へ移動する。

【0019】全血の細胞性成分を血漿または血清から分離する別の従来法は、Vogel et al.の米国特許第4,477,575号に開示された。ここには、一定の平均直径および密度を有するグラスファイバーの層を用いて全血から血漿または血清を分離する方法および組成物が記載された。しかしながら、分離され得る血漿または血清の量は、最大でグラスファイバーの吸収容量の50%、好ましくは30%未満に限られている。そうでなければ、全血は効果的にグラスファイバー層をつまらせてしまう。したがって、この方法は全血容量に対して高い比率の疎水性グラスファイバーを必要とする。

【0020】他の従来法においては、予め決められた可溶性血漿もしくは血清成分に関してアッセイする前に、全血を希釈する。全血の希釈は、余分な操作工程を必要とし、血液試料の誤った希釈によるアッセイ誤差の可能性を導入するので、厄介である。実験者が潜在的に感染性の血液試料と接触する可能性もまた増加する。例えば、ドイツ特許公報DE-OS 34 41 149号は、アッセイを実施する前に、血漿または血清を希釈するために希釈液でくり返しすいだレクチン含浸マトリックスに全血を通過させることによって、全血から血漿または血清を分離する方法を開示した。レクチンまたは重合アミノ酸を、全血試料から細胞性物質を分離するために用いることは、ヨーロッパ特許出願第84307633.2号にも開示されている。

【0021】少量の全血試料を分離し、アッセイするための方法および試験具を開発するに当たって、第一に考慮することは、アッセイを実施する実験者の習熟の度合いである。比較的熟練していない人員にルーチンのアッセイを行わせ、正確な定量的結果を得ることが、しばしば望ましい。したがって、アッセイ方法は、操作工程が最小限であり、干渉や汚染の可能性がなく、実験者が物理的に血液試料と接触する可能性が最小限または皆無であり、容易に測定値を与えるものであることが重要である。例えば、いくつかの可能な操作工程の中で、実際のアッセイの前の、全血、血漿または血清の希釈は、アッセイ誤差や実験者の血液試料との接触が最も起こり易い工程を導入する。別の一般的な操作誤差は、全血の血漿または血清から細胞性成分を分離するために細胞不透性膜を用いる試験具の表面から、全血の細胞性成分を不完全に拭き取ったり、すすぎ落としたりすることである。

【0022】したがって、少容量の全血を効率的に分離し、正確にアッセイするための方法および試験具に対する必要性が存在する。その方法は、好ましくは、1) 血漿または血清から細胞性成分を分離し、次いで2) アッ

セイの前に血漿または血清から特定の成分を分離する、別々の操作工程を回避する。さらに、希釈誤差を避けるためには、その方法は、好ましくは希釈されていない血漿または血清のアッセイを可能にする。また、実験者を血液試料との接触から保護し；現行の方法の時間的遅れを回避し；血液試料のヘマトクリット値に依存せず；正確で再現性のある結果を生み出す、血液分離および血液アッセイ法を提供することが望ましい。

【0023】理想的な方法としては、例えば針で刺した一滴のような「非侵襲性」量の全血試料を採取し、直ちに、希釈されていないその全血試料を試験具に与えること、そしてその試験具が希釈されていない血漿または血清から細胞性成分を分離し；望ましくない、または干渉性の成分を血漿または血清から分離し；次いでLDL画分やVLDL画分のような望ましくない成分を含まず、希釈されていないその血漿または血清を、HDLコレステロールのような予め決められた可溶性成分の存在または濃度に関して、数分以内にアッセイするものであることが挙げられる。あるいは、そうでなければ、試験具を新鮮な刺し傷に接触させ、その傷から新鮮な希釈されていない血液試料を分析のために採取させることもできる。このような分離およびアッセイの方法および試験具は、医療従事者が全血分析をよりルーチンに、より信頼できる環境で実施することを可能にする。

【0024】結果として、研究者らは、全血の細胞性成分を分離し、集め、保持する要素を含む試験具を開発する試みを続けてきた。このような試みの例は、Vogel et al.の米国特許第4,477,575号；Rothe et al.の米国特許第4,604,265号；Kennedy et al.のPCT/US86/02192出願；Rapkin et al.の米国特許第4,678,757号；Terminiello et al.の米国特許第4,774,192号；Stoneの米国特許第3,607,093号；Figuerasの米国特許第4,144,306号；およびPierce et al.の米国特許第4,258,001号に開示されている。

【0025】上記の特許（出願）の各々が、血漿または血清から全血の細胞性成分を分離することに向けられている。しかしながら、結果として生じる血漿または血清は、HDL画分、LDL画分およびVLDL画分を含有する。したがって、全血試料中のHDLコレステロールの量を正確に測定するためには、LDL画分およびVLDL画分から血清または血漿中のHDL画分を分離することが、なお必要である。ある研究者らは、この第二の分離を、例えばLDL画分およびVLDL画分中のコレステロールの合計と総コレステロール濃度との差から、血漿または血清中のHDLコレステロールを間接的にアッセイすることによって、あるいは同様の間接法によって回避しようとした。

【0026】例えば、Ziegenhorn et al.は、米国特許第4,544,630号において、LDL画分が、HD

L画分より実質的に速く、酵素試薬と相互作用する条件下での直接酵素的測定によって、HDL画分の存在下でLDL画分中のコレステロールに関してアッセイする方法を開示している。Searsは、米国特許第4,126,416号および4,190,628号において、LDL画分を植物レクチンで凝集させて他の画分からLDLコレステロールを分離し、次いで凝集したLDL画分中のコレステロールの量を検出することによる、血漿中のLDLコレステロールに関する方法およびアッセイキットを開示している。Searsは、LDL画分中のコレステロールをアッセイし得ること、あるいは、そうでなければHDL画分およびVLDL画分を含む上清液中のコレステロールをアッセイし得ること、するとLDLコレステロール濃度を間接的に測定し得ることを開示している。

【0027】ドイツ特許公報DE-OS 31 17 455号は、LDL画分およびVLDL画分を沈殿させるためにホスホタングステン酸およびマグネシウムイオンを含む沈殿試薬を開示している。次いで、上清液のHDL画分中のコレステロールを測定し得る。試験試料中の総コレステロール濃度がわかっているならば、HDLコレステロールアッセイは、LDLコレステロールに関してアッセイする間接的な方法に用いられる。上記の参考文献のどれひとつとして、試験試料が全血であり、かつ別個の沈殿、遠心分離または希釈工程なしにHDLコレステロールに関してアッセイするために、全血の細胞性成分を最初に全血試料から分離し、続いてHDL画分からLDL画分およびVLDL画分を分離する方法または試験具を、教示または示唆していない。本明細書において後により詳しく明らかにするように、本発明は、実験者を潜在的に感染性の試験試料にさらしたり、アッセイ誤差につながるような時間のかかる操作工程なしに、少量の全血試料をアッセイする方法および試験具を提供する。

【0028】McGowanは、米国特許第5,118,613号において、全血試料を用いるHDLリポタンパク質成分の測定を開示している。最初に、全血試料をエチレンジアミン四酢酸のような化合物で抗凝固処理する。LDL画分およびVLDL画分を、次いで抗凝固処理した全血から、マグネシウムイオンおよび硫酸デキストランによって沈殿させる。LDL画分、VLDL画分および細胞性成分を遠心分離によって溶液から分離し、実質的に全てのHDL画分を含有する上清溶液をコレステロールのようなHDL成分に関してアッセイする。この方法は、時間がかかり、潜在的に感染性の操作工程である遠心分離を含む。

【0029】他の研究者らは、操作的な希釈工程および遠心分離工程を除いた血液アッセイ用試験具を開示した。例えば、Kondo et al.は、米国特許第4,256,693号において、コレステロールのような種々の血清成分に関してアッセイするための多層試験具を開示して

いる。Kondo et al.の試験具は、全血の細胞性成分を除去するためのフィルター層を含む。フィルター層は、少なくとも1つの小さい開口を有する防水層の上に位置している。フィルター層を出ていく血漿または血清は、防水層の小さい開口を通過し、まず拡散層に接触し、次いで試験域に接触する。目的の分析対象物は、次いで試験域に含有されている試薬と相互作用し、検出可能な応答が試験具の底を通して観察される。Kondo et al.の試験具は、全てのリポタンパク質画分がフィルター層を出て最終的に試験域を飽和するので、HDLコレステロールを測定することができない。したがって、Kondo et al.の試験具によって、総コレステロールのみがアッセイされる。その上、本明細書において後により詳しく明らかにするように、Kondo et al.の試験具は、本発明の重要な特徴である毛細管を含まない。

【0030】Blatt et al.は、米国特許第4,761,381号において、反応室(reaction chamber)への液体試料を測るために毛細管チャンネルを含む容量計測試験具を開示している。Blatt et al.の試験具においては、試験試料はろ過されない。したがって、全血のアッセイにおいては、不均一な発色および高ヘマトクリット領域でのヘマトクリット干渉のため、コレステロールに関する色原性アッセイでは細胞性物質の干渉を受ける。さらに、リポタンパク質画分が分離されず、それによりHDLコレステロールに関する全血試料のアッセイが除外される。

【0031】Hillman et al.は、米国特許第4,753,776号において、フィルターと、フィルターから反応域へ出ていく血漿または血清を流れさせるための毛細管チャンネルとを含む血液分離試験具を開示している。Hillman et al.は、血漿または血清からさらにVLDL画分およびLDL画分を分離してHDLコレステロールをアッセイする方法および試験具を提供することを、教示または示唆していない。

【0032】ヨーロッパ特許出願第1,68,093号は、LDL画分のための結合剤(binder)を開示する。結合剤は、硫化ポリビニルアルコールを水不溶性基材に架橋したものである。このヨーロッパ特許出願は、しかし、HDLコレステロールに関してアッセイする方法において、血漿または血清から全血の細胞性成分を分離し、続いてリポタンパク質画分を分離することを教示していない。Kerscher et al.の米国特許第4,746,605号は、HDL画分を試験試料から沈殿させ、続いて上清液をLDL画分に関してアッセイすることを教示している。これに対して、本発明の方法および試験具は、まず細胞性成分を分離し、次いでLDL画分およびVLDL画分を血漿または血清から分離した後に、HDLコレステロールに関して血漿または血清をアッセイする。

【0033】

【課題を解決するための手段】したがって、上記の方法および試験具に存在する欠点のため、全血から細胞性成分を分離して、実質的に細胞を含まず、変化しておらず、希釈されていない血漿または血清を提供する、そして、HDLコレステロールのような予め決められた分析対象物に関して血漿または血清をアッセイする前に、血漿または血清の望ましくない干渉性成分を分離する、簡便で効果的な方法が必要であることは明らかである。したがって、本発明の方法は、血漿または血清から全血試料の細胞性成分を分離し保持する第一のゾーンと、血漿または血清からLDL画分およびVLDL画分を分離する第二のゾーンとを含む分離域を有する試験具を用いることによって、HDLコレステロールに関する安全で正確で経済的な全血試料のアッセイを可能にする。第二のゾーンは、HDLコレステロールに関するアッセイのために必要な試薬を包含する試験域と密接に接触しているか、またはそれとフルイドコミュニケーションの状態にある。血漿または血清は、希釈されていない形態で分離域を出て、次いで試験域へ移動する。試験域では、HDLコレステロールとアッセイ試薬との相互作用が、色遷移のような検出可能な応答を生じる。この応答は、高度に有色の細胞性成分による干渉、およびLDL画分およびVLDL画分に存在するコレステロールによる干渉を受けない。

【0034】本発明の方法および試験具は、試験試料を遠心分離または希釈する長々とした高価で余分な操作工程を行うことなく、HDLコレステロールに関して全血をアッセイすることを可能にする。試験パッドを飽和する血漿または血清は、実質的に細胞性物質、VLDL画分およびLDL画分を含まず、かつ変化しておらず、希釈されていないので、それによりHDLコレステロールに関する正確で信頼に値するアッセイを可能にする。本発明の方法および試験具は、また、ヘマトクリット感受性；試験具から細胞性成分をすずぎ落したり拭き取ることによる技術感受性；および細胞成分の廃棄といった欠点を除く。

【0035】本発明のひとつの態様によれば、全血試料が分離域を通過して試験域を飽和した後に、実質的にVLDL画分およびLDL画分を含まず希釈されていない血漿または血清で飽和された試験パッドを、次いで標準的な乾相化学(ドライケミストリー)試験ストリップ手順によって、HDLコレステロールに対する応答に関して調べる。好ましい態様においては、分離域は試験具から除去されず、分離域と接触していない試験パッドの表面が、例えば透明支持体を通した検査によって、応答に関して調べられる。

【0036】本発明の別の態様によれば、分離域と試験域は密接に接触していないが、毛細管によってフルイドコミュニケーションの状態にある。この態様においては、実質的に細胞を含まず、LDLを含まず、かつVLDL

DLを含まない血漿または血清は、試験具の分離域から毛細管を通して、試験試料中のHDLコレステロールのアクセシのために試験具の試験域へ移動する。分離域は、全血試料の細胞性成分を除去するための第一のゾーンと、血漿または血清からVLDL画分およびLDL画分を除去するための第二のゾーンとを含む。

【0037】本発明の別の重要な特徴によれば、試験具は、実験者と全血試料との接触を除外する。血液試料は、過剰な血液試料が試験具の外表面に留まらないような仕方

で分離域に吸収される。その上、実験者は、応答に関する試験具の検査の前に、試験具から細胞性成分をすすぎ落としたり拭き取ったりする必要がない。結果として、試験具は、実験者と潜在的に感染性の血液試料との接触の可能性を排除する。

【0038】本発明の結果として、HDLコレステロールに関する血漿または血清のアクセシは、正確で信頼性があるものとなる。なぜなら、高度に有色の細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分による干渉が実質的に排除されるからである。従来の方法および試験具は、遠心分離によって血液試料から細胞性成分を分離すること、ならびに血液試料からLDL画分およびVLDL画分を沈殿および遠心分離することに依っていた。次いで、血清または血漿を、時間がかかり、試料と試薬の操作を必要とする湿式化学（ウェットケミストリー）手順によってHDLコレステロールに関してアクセシした。本明細書中において後により詳しく明らかにするように、本発明の試験具は、固体または液体相のHDLコレステロールに関して全血試料をアクセシする、速くて正確で経済的な方法を提供し、それにより試料の希釈、試薬および血清の操作および実験者と血液試料との接触が排除される。

【0039】本発明において用いる分離域は、場合により比較的少量の分離試薬組成物、例えばレクチンのようなアグルチニン；トロンビンまたはトロンビン様化合物のような凝固剤；あるいはそれらの組合せを包含しているもよいフィルターパッドまたはフィルターパッドの一部分を含む第一の分離ゾーンを用いることにより、全血試料から細胞性成分を効果的に分離する。分離域の第一のゾーンに場合により包含される分離試薬組成物は、血清または血漿中のリポタンパク質画分の濃度に影響しない。

【0040】分離域は、マグネシウムイオンのような多価金属イオンおよび硫酸デキストランのような沈殿化合物を含む沈殿試薬組成物をその中に包含する、フィルターパッドまたはフィルターパッドの一部分を含む第二の分離ゾーンを用いることにより、血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を効果的に分離する。したがって、HDL画分を含む、希釈されておらず、細胞を含まない血清または血漿は、次いでHDLコレステロールのアクセシのために試験域に移動する。さらに、血清

または血漿は試験域全体に均等に分配され、試験具の試験域全域に均一なアクセシ応答を提供する。

【0041】本発明の重要な特徴によれば、本方法および試験具は、湿相の沈殿および遠心分離工程を排除し；実験者による試験試料の取扱いを排除し；試験試料の希釈および同様の操作的工程を排除し；少容量の血液試料を用い；そして血液試料間のヘマトクリット差に関する修正を排除するHDLコレステロールアクセシを提供する。結果として、本発明の試験具は、より経済的であり；全血試料から実質的に全ての細胞性成分ならびにVLDL画分およびLDL画分を分離し；そして速く、より一貫性のある、より再現性の高いHDLコレステロールアクセシを提供する。

【0042】手短かに言えば、本発明は、付加的な操作工程なしに、全血試料から細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分を分離し、次いで希釈されていない血清または血漿をHDLコレステロールアクセシする試験具および方法に向けられている。本発明の方法および試験具によって血清または血漿から全血の細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分を分離することは、HDLコレステロールの正確なアクセシのための希釈されていない血清または血漿を提供する。分離方法およびアクセシ試験具は、血清または血漿に汚染物を導入せず、血清または血漿の組成に悪影響を与えない。

【0043】本発明の重要な特徴によれば、試験具は、血清または血漿から全血の細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分を分離する分離域を有する。ひとつの態様においては、分離域は、HDLコレステロールに関して希釈されていない血清または血漿をアクセシする試験パッドと密接に接触している。別の態様においては、試験具の分離域は、毛細管によって試験域とフルイドコミュニケーションの状態にある。分離域は、全血試料から細胞性成分を分離する第一のゾーンと、血清または血漿から可溶性のLDL画分およびVLDL画分を分離する第二のゾーンとを含む。

【0044】分離域は、好ましくは1つ以上のフィルターパッドを含む。本発明のひとつの態様においては、分離域の第一のゾーンは、血清または血漿からの細胞性血液成分の分離を助けるために、場合により分離試薬組成物をその中に包含しているもよい好適な担体マトリックスを含むフィルターパッドである。本発明によれば、第一の分離ゾーンのフィルターパッドは、全血試料から細胞性成分を効果的に分離し、それにより血清または血漿中のHDLコレステロールに関する色原性アクセシに対する細胞性成分の干渉を除外する。

【0045】希釈されておらず変化してない形態の血清または血漿は、HDL画分を血清または血漿から分離せずに、血清または血漿から効果的にLDL画分およびVLDL画分を分離するフィルターパッドを含む第二の分離ゾーンへと、第一の分離ゾーンから移動する。HDL

画分を含有する血清または血漿は、次いで試験域へ移動し、試験域に包含されている試薬組成物によって、HDLコレステロールに関してアッセイされる。本方法および試験具は、実験者の、潜在的に感染性の血液試料との接触をも実質的に除外する。代替的な態様においては、分離域は、単一のフィルターパッドを含んでおり、該フィルターパッドの一部分が第一の分離ゾーンを含み、該フィルターパッドの第二の部分が第二の分離ゾーンを含んでいる。

【0046】本発明のひとつの態様においては、試験具の分離域と試験域とは密接に接触しており、分離域の第二のゾーンを出ていく血清または血漿が、直接、試験域へと移動するようになっている。試験域は、HDLコレステロールアッセイに必要な試薬類を含有し、次いで応答が監視される。別の態様においては、分離域と試験域は、毛細管によってフルイドコミュニケーションの状態にある。分離域では、細胞性成分、VLDL画分およびLDL画分が試験試料から分離される。希釈されていない血清または血漿は、次いで毛細管を通して試験具の試験域へと移動する。血清または血漿は試験域に集められ、HDLコレステロールのアッセイに必要な試薬類との相互作用が可能になる。必要な試薬は、血清または血漿が集められる前または後に、試験域に導入することができる。試験具の試験域は、次いで応答に関して検査され、血液試料のHDLコレステロール濃度が測定される。

【0047】本発明は、技術依存性、例えば沈殿および遠心分離、操作工程をアッセイから排除し、また、正しい容量の血清または血漿が試験具の試験域と接触することを確かにする。さらに、実験者の、潜在的に感染性の血液試料との接触を、実質的に除外するので、HDLコレステロールに関する代替的なアッセイ法が企図される。ここでは、集められた血清または血漿を、ピペットなどを用いて試験具から採取し、次いで公知の乾相または湿相診断技術によってHDLコレステロールに関してアッセイする。

【0048】本発明の方法は、まず全血試料を試験具と接触させることを含む。この試験具は：(a) 全血の細胞性成分を分離する第一のゾーンと、血液から可溶性LDL画分およびVLDL画分を分離する第二のゾーンとを含む分離域、ならびに(b) HDLコレステロールに関してアッセイするための試薬組成物を包含する試験域を含む。本明細書中において、そしてこれ以降の本明細書中において用いられる「試薬組成物」という表現は、HDLコレステロールとの接触に際し、検出可能な相互作用を起こす化学物質または化学物質の混合物と定義される。

【0049】全血試料は、当初、分離域の第一のゾーンと接触する。第一の分離域は、担体マトリックスまたは担体マトリックスの一部分を含み、場合により全血試料

からの細胞性成分の分離を助けるための試薬を含んでいてもよい。全血試料は第一の分離ゾーンを通して浸透し、そこで全血の赤血球ならびに他の細胞性成分および粒状成分が、担体マトリックスおよび場合により含まれる分離試薬組成物の作用を通じて血清または血漿から分離される。希釈されておらず、変化していない血清または血漿は、第一のゾーンを通して浸透し続け、第一のゾーンと接している第二のゾーンと接触する。

【0050】第二の分離ゾーンは、担体マトリックスまたは担体マトリックスの一部分を含んでおり、血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を効果的に分離するが、血清または血漿中のHDL画分の濃度を実質的に変えない沈殿試薬組成物を包含する。血清または血漿は、第二の分離ゾーンを通して浸透し続け、第二のゾーンと接触しているか、または試験具の試験域に血清または血漿を送達するために例えば毛細管を通して第二のゾーンとフルイドコミュニケーションの状態にある試験域と接触する。場合によっては、第三のゾーンが試験具の分離域に含まれている。第三のゾーンは、担体マトリックスまたは担体マトリックスの一部分を含み、試薬で処理されていない。第三のゾーンは、血清または血漿から細胞性成分、LDL画分およびVLDL画分の最後の痕跡を除去するのに役立つ。

【0051】目的とするアッセイは、試験具の試験域で実施される。希釈されていない血清または血漿は、指示試薬組成物と相互作用して、試験域に色変化のような検出可能な、好ましくは測定可能な変化を生じ、HDLコレステロールの存在を示すか、またはHDLコレステロールの定量的測定を可能にする。試験域は、次いで試験試料中に存在するHDLコレステロールに対する定性的または定量的応答に関して、視覚によりまたは機器により検査される。結果として、実験者誤差や、実験者と潜在的に感染性の血液試料との接触につながり得る操作的工程なしに、血液試料から干渉性の細胞性成分ならびにVLDL画分およびLDL画分を効果的に分離する、簡便で安価な試験具を用いてHDLコレステロールのアッセイが達成される。

【0052】したがって、本発明は、(a) 希釈されていない全血の血清または血漿から細胞性成分を迅速に効果的に分離し、(b) 該血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を分離し、そして(c) 次いで該血清または血漿をHDLコレステロールに関してアッセイするための方法および試験具に分けられている。より詳しくは、そして本発明の重要な特徴によれば、分離域の少なくとも2つのゾーンが、全血から細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分を分離するために、そしてHDL画分を含有する血清または血漿が分離域と接しているかまたは毛細管で接続されている試験域へ移動するのを可能にするために、配置されている。試験域が血清または血漿で飽和された後、血清または血漿は試薬

組成物と相互作用し、次いで試験域がHDLコレステロールに対する応答に関して検査される。したがって、定性的または定量的全血の細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分によるアッセイ干渉が排除され、そのためより正確でより信頼し得るHDLコレステロールに関する血清または血漿アッセイが達成される。

【0053】本発明の重要な特徴によれば、第一の分離ゾーンと第二の分離ゾーンとを含む分離域を有する試験具と、全血試料とが接触する。第一のゾーンは、好適な担体マトリックスを含んでおり、全血試料からの細胞性成分の分離を助けるために、その中に場合により包含されるのは、レクチンのようなアグルチニン；トロンビンまたはトロンビン様化合物のような凝固剤；あるいはそれらの混合物を含む細胞分離試薬組成物である。本発明の十分な利点を達成するためには、全血試料は、レクチンを含む分離試薬組成物を包含する好適な担体マトリックスからなる第一の分離ゾーンと接触する。第一のゾーンは、血清または血漿から全血の細胞性成分を分離し、血清または血漿に干渉性のイオンや分子を添加したり、あるいは血清または血漿から可溶性成分を除去しない。

【0054】血清または血漿は、次いで分離域の第二のゾーンへ移動する。第二の分離ゾーンは、多価金属イオン、好ましくは二価金属イオンと沈殿化合物とを含む沈殿試薬組成物をその中に包含する好適なマトリックスからなり、血清または血漿から可溶性LDL画分およびVLDL画分を分離する。本発明の十分な利点を達成するためには、血清または血漿は、多価金属イオンとしてマグネシウム、および沈殿化合物として硫酸デキストランを含む沈殿試薬組成物を包含する好適な担体マトリックスからなる第二の分離ゾーンと接触する。第二のゾーンは、血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を分離し、血清または血漿に干渉性のイオンや分子を添加したり、あるいは血清または血漿からHDL画分を除去しない。

【0055】本発明の別の重要な特徴によれば、HDL画分を含有する血清または血漿は、試験具の試験域と接触し、当業界で公知の診断アッセイ試薬によってHDLコレステロールに関してアッセイされる。試験域は、試験具の分離域と密接に接触していてもよく、あるいは毛細管によって分離域とフルイドコミュニケーションの状態にあってもよい。分離域と試験域とが密接に接している場合、試験具は経済的な試験ストリップに成形されていることができる。試験ストリップは、血中のHDLコレステロールレベルを迅速に正確に測定するために、医療従事者によってまたは家庭の個人によって使用され得る。

【0056】したがって、本発明の重要な側面は、少量の全血試料の血清または血漿から細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分を速く効果的に分離し、次いで血清または血漿をHDLコレステロールに関してア

ッセイするための方法および試験具を提供することである。本発明の方法および試験具は、付加的な操作的工程なしに血清または血漿をHDLコレステロールに関してアッセイし得るように、血清または血漿からの全血の細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分の迅速で容易で効果的な分離を可能にする。したがって、希釈されておらず変化していない血清または血漿のHDLコレステロールに関するアッセイにおいて、全血の細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分による干渉が排除される。さらに、アッセイは血液試料中のヘマトクリット量に依存しない。したがって、ヘマトクリット差に関するアッセイの修正が排除される。

【0057】本発明の新規で改良された試験具は、HDLコレステロールに関して少容量の全血試料を定性的にまたは定量的にアッセイすることができ、全血試料の細胞性成分ならびに可溶性LDLおよびVLDL画分によるアッセイ干渉を実質的に排除する。HDLコレステロールに関して希釈されていない全血試料をアッセイするための試験具は、(a) 全血の細胞性成分を除去する第一のゾーンと、血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を除去する第二のゾーンとを含む分離域；ならびに(b) 分離域と密接に接触するかまたはフルイドコミュニケーションの状態にあつて、指示試薬組成物を包含し、HDLコレステロールに関して血清または血漿をアッセイするための試験域を含む。

【0058】1つの態様においては、試験具の試験域は、血清または血漿中のHDLコレステロールと相互作用する試薬組成物を均一に包含し得る基材物質を含む。この態様においては、分離域の第二のゾーンは、試験パッドと密接に接触しており、そして多価金属イオンと沈殿化合物とを含み、血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分と相互作用して分離する、沈殿試薬組成物をその中に包含する好適な担体マトリックスを含む。分離域の第一のゾーンは、第二のゾーンと密接に接触しており、そして場合によりレクチン、トロンビンまたはトロンビン様化合物を含み、血清または血漿から全血試料の細胞性成分と相互作用してその分離を助ける、分離試薬組成物をその中に包含していてもよい好適な担体マトリックスを含む。したがって、分離域と試験域は、HDLコレステロールに関してアッセイするための乾相試験ストリップを提供するために多層型配列(アレイ)に成形され得る。

【0059】別の態様においては、試験域は、毛細管により分離域とフルイドコミュニケーションの状態にある。HDL画分を含有する血清または血漿は、分離域を出て、毛細管により試験域に導入される。血清または血漿は、後のアッセイのために試験域に集められることもでき、あるいは直ちにアッセイされ得る。全血中のHDLコレステロールの存在または濃度に関してアッセイする新規で改良された試験具および方法は、訓練されてい

10

20

30

40

50

ない個人によって家庭で実施され得る。なぜなら、このアッセイは、迅速で再現性がよく、少容量の血液を必要とし、血液試料のヘマトクリット濃度に依存せず、それによりヘマトクリット差に関してアッセイ結果を修正する必要を排除するためである。

【0060】本発明の上記およびその他の側面、利点および新規な特徴は、以下の本発明の好ましい態様の詳細な記載と、それと共に載せられている以下の図によって明らかになるであろう。

【0061】図1は、本発明の試験具の透視図であり、ここでは、血清または血漿から全血の細胞性成分を分離し、かつHDL画分からVLDL画分およびLDL画分を分離するための分離域と、HDLコレステロールに関して血清または血漿をアッセイするための試験パッドとが、毛細管で連結されている；

【0062】図2は、本発明の試験具の別の態様の透視図であり、ここでは分離域と試験域とが毛細管で連結されている；

【0063】図3は、本発明の試験具のさらに別の態様の透視図であり、ここでは、分離域は、HDLコレステロールに関するアッセイのための血清または血漿を集める毛細管の上に位置している；

【0064】図4は、本発明の試験ストリップ状試験具の端面図であり、第一の血液分離フィルターパッド、第二のVLDL画分およびLDL画分分離用フィルターパッド、場合により存在する第三のフィルターパッドおよびHDLコレステロールに関してアッセイするための試験パッドの層状形態を示す；

【0065】図5～図8は、血清中およびろ過していない血清中に存在するリポタンパク質画分を示すプロットであり、ここでは、VLDL画分およびLDL画分は、沈殿または本発明の試験具のどちらかによって分離されている。

【0066】本発明の方法によれば、全血試料の細胞性成分は、最初に血清または血漿から分離され；次いで、LDL画分およびVLDL画分が、希釈されておらず、変化していない血清または血漿から分離され；次に、さらなる操作的工程なしに、血清または血漿がHDLコレステロールに関してアッセイされる。本発明の方法および試験具によれば、少量の血液試料、通常針で刺して得られる量が、細胞性成分ならびにVLDL画分およびLDL画分の分離を達成し、血清または血漿をHDLコレステロールに関してアッセイするために十分に大量である。これに対して、全血から細胞性成分を分離する遠心分離法、および血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を分離する超遠心法においては、ミリリットルサイズの血液試料が必要とされる。さらに、本発明の方法および試験具は、実験者誤差や実験者と潜在的に感染性の全血試料との接触を起こし得る、希釈のような操作的工程を排除する。

【0067】驚くべきことに、そして予期せぬことに、本発明の試験具は、高度に有色で干渉性の赤血球ならびにVLDL画分およびLDL画分を、血清または血漿から実質的に完全に分離し、次いで、沈殿、遠心分離、デカンテーションまたは希釈のような、時間がかかり、潜在的に健康を害する付加的な操作工程なしに、数分以内にHDLコレステロールに関して血清または血漿をアッセイする。本発明の方法は、簡便で安価な試験具を用いて、約65%以下のヘマトクリットを含有する少量の試料、例えば20 μ lの全血について、迅速で信頼できるアッセイを提供する。全体として、本発明の方法および試験具は、アッセイの数が比較的少なく、しかしそれにもかかわらず正確な結果が短い時間内に必要とされるような、家庭や、小さい実験室および個人の医療オフィスでのルーチンの血液アッセイに理想的に適している。

【0068】以下の本発明の詳細な記載から明らかになるように、本発明の方法および試験具は、全血の種々の可溶性成分の存在または濃度を測定するための色原性応答を利用するアッセイに特に適している。したがって、色原性応答の正確で信頼できる検出および測定を達成するためには、全血試料から高度に有色の赤血球を除去することが、第一に重要である。さらに、HDLコレステロールのアッセイにおいては、実質的に細胞を含まない血清または血漿から干渉性のLDL画分およびVLDL画分を除去することも、また重要である。

【0069】血清または血漿から全血の細胞性成分を、そして血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を分離する、いかなる方法または試験具も、迅速に効率的に細胞、LDL画分およびVLDL画分の分離を達成し；HDL画分ではなく、細胞性成分、LDL画分およびVLDL画分のみを除去し；干渉性イオンまたは分子による血清または血漿の汚染を回避し；赤血球が破裂して高度に有色の成分を血清または血漿に放出する溶血を排除するべきである。血液試料の潜在的に感染性の性質のため、方法および試験具はまた、人間と血液試料との接触を最小限にするか、排除すべきである。

【0070】本発明の重要な特徴によれば、全血試料を、フィルターパッドのような好適な担体マトリックスを含む第一のゾーンを有する分離域と接触させ、それを通して浸透させることにより、全血の細胞性成分が、実質的に無色の血清または血漿から効果的に分離される。担体マトリックスは、場合により分離試薬組成物を含有する。該分離試薬組成物は、レクチンのようなアグルチニン；またはトロンビンもしくはトロンビン様化合物のような凝固剤；あるいはそれらの混合物を含む。分離試薬組成物は、全血試料から高度に有色の細胞性成分を除去し、可溶性成分の簡便で正確な測定にかけられる淡黄色の血清または血漿を生じる、担体マトリックスの固有の能力を強化する。

【0071】希釈されておらず、変化していない淡黄色の

血清または血漿は、次いで分離域の第二のゾーンに向けられる。第二の分離ゾーンは、血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を除去するためにその中に包含された沈殿試薬組成物を有する、フィルターパッドのような好適な担体マトリックスを含む。血清または血漿は第二の分離ゾーンと接触し、それを通して浸透し、そして、1) 多価金属イオン、好ましくはマグネシウムイオンのような二価金属イオン、および2) 沈殿化合物、例えば硫酸デキストランを含む沈殿試薬組成物が、血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を除去するが、しかし血清または血漿からHDL画分を除去しない。場合によっては、分離域の処理されていない第三のゾーンが、第二のゾーンを出ていく血清または血漿を受け取るように位置する。第三のゾーンは、血清または血漿から細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分の最後の痕跡を除去する。

【0072】分離域の最後のゾーン、すなわち第二または第三のゾーンは、試験具の試験域と密接に接触していてもよく、あるいは毛細管によるなどして試験具の試験域とフルイドコミュニケーションの状態であることもできる。最後のゾーンが試験域と密接に接している場合、試験域は一般に試験パッドを含む。したがって、ひとつの態様においては、全血が第一の分離ゾーンを通して浸透するにつれて、細胞性成分は全血試料から分離されて、第一のゾーンに集められ、保持される。変化していない血清または血漿は、次いで第二の分離ゾーンに進行してそれを飽和する。第二の分離ゾーンは、第一のゾーンと層状接触の状態にあって、血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を除去する。HDL画分を含有する血清または血漿は、次いで第二の分離ゾーンと層状接触の状態にある試験パッド、あるいは存在すれば第三の分離ゾーンに進行してそれを飽和する。試験パッドは、HDLコレステロールと相互作用して検出可能または測定可能な応答を与える試薬組成物をその中に包含する好適な基材物質を含む。試験パッドが血清または血漿によって飽和された後、血清または血漿中に存在するHDLコレステロールに対する、例えば色原性応答のような応答に関して、視覚的にまたは機器により試験パッドを検査する。

【0073】別の態様においては、試験域は第二のゾーンもしくは場合により存在する第三のゾーンと接触しておらず、しかし毛細管によって試験具の分離域とフルイドコミュニケーションの状態にある。この態様においては、HDL画分を含有する血清または血漿は、分離域を出て毛細管に入る。毛細管は、血清または血漿を集め、次いで該血清または血漿を試験具の試験域へ送達し、そこで血清または血漿は集められてHDLコレステロールに関してアッセイされる。試験域はHDLコレステロールに関してアッセイするための試薬組成物を含有してもよく、あるいは試薬組成物を、HDLコレステロールに

関してアッセイするために、集められた血清または血漿に後に添加してもよい。

【0074】一般に、本発明の分離域の第一のゾーンは、全血試料の細胞性成分をろ過する固有の能力を有する担体マトリックスを含む。好ましくは、該担体マトリックス、例えばフィルターパッドは、全血試料から実質的に全ての細胞性成分をろ過する固有の能力を有する。担体マトリックスは、通常、血清または血漿から全血の細胞性成分を分離することができる親水性で吸収性のマトリックスであり、全血試料からの細胞性成分の実質的に完全な分離を容易にするために場合により用いられる分離試薬組成物を包含し得る。分離された細胞性成分を集めて保持することに加えて、担体マトリックスは、血清または血漿が第一の分離ゾーンを実質的に妨害されず、変化せずに通過して、分離域の第二のゾーンに接触することを可能にする。

【0075】第一のゾーンの担体マトリックスはまた、赤血球の効率的な分離を可能にするのに充分な速度で、かつ比較的速く血液アッセイを行うのに充分迅速に、血液試料が第一のゾーンを浸透することを可能にするべきである。その上、担体マトリックスは、溶血を促進したり、血清または血漿による担体マトリックスの成分の抽出によって血清または血漿を汚染したり、化学的もしくは物理的相互作用によって血清または血漿成分を除去したり、あるいは希釈されていない血清または血漿を、後のHDLコレステロールアッセイが結論的でないか、不正確なまたは疑わしいものになるような形で認め得るほど変化させたりしてはならない。

【0076】好ましくは、分離域の第一のゾーンは、上記の特性を有する親水性担体マトリックスと、分離試薬組成物とを含む。担体マトリックスは、血液が毛細管力に応じて第一のゾーンを通して移動することを可能にする。細胞性成分は、分離試薬組成物と担体マトリックスによって血清または血漿から分離され、第一のフィルターパッドに保持される。実質的に変化していない血清または血漿は、次いで第一のゾーンを通して進行し続け、第一のゾーンに接している第二の分離ゾーンに接触し、それを飽和する。

【0077】担体マトリックスは、実質的に細胞を含まない淡黄色の血清または血漿のみが、第一のゾーンを通して、HDLコレステロールの分析のための試験域に最終的に接触することを可能にする、いかなる親水性物質であってもよい。好適な親水性担体マトリックスとしては、吸水性および非吸水性、繊維性および非繊維性マトリックス、例えば、シリカゲル、アルミナ、ケイ藻土などのような親水性無機粉末；スポンジ材；粘土質物質；布；親水性天然高分子物質、特にセルロースビーズのようなセルロース系物質、そして特にろ紙またはクロマトグラフ紙のような繊維含有紙類；ならびに合成または改変天然ポリマー、例えばセルロースアセテート、ポリ塩

化ビニル、ポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリウレタン、架橋デキストラン、アガロースおよびその他のそのような架橋または非架橋の水不溶性親水性ポリマーが挙げられる。同様に、その他の好適な担体マトリックスとしては、グラスファイバーマトリックスのような繊維性および非繊維性マトリックス；および合成ポリマー、例えばポリプロピレン、ポリエチレン、ナイロン、フッ化ポリビニリデン、またはポリスルホンが挙げられる。硬質の多孔性プラスチックもまた、該プラスチックを通して血清または血漿が浸透し、試験域に接触するのに充分な多孔性を有する限りは、担体マトリックスとして有用である。

【0078】したがって、細胞性成分の効率的な分離を達成し、第一のゾーンを通して血清または血漿を進行させるためには、第一の分離ゾーンの担体マトリックスは、約 0.1μ （ミクロン）～約 50μ 、好ましくは約 0.3μ ～約 10μ の孔サイズを有する。本発明の充分な利点を達成するためには、担体マトリックスは、約 0.5μ ～約 8μ の範囲の孔サイズを有する。

【0079】分離域の第一のゾーンは、2つ以上のマトリックスを含むことができる。複数のマトリックスは、異なる物理特性を有することができ、異なる化学組成物または化学組成物の混合物であってよい。第一のゾーンの単数または複数のマトリックスは、滑らかさと粗さ、および硬さと柔らかさの点において変化し得る。しかしながら、いかなる場合にも、第一のゾーンの単数または複数のマトリックスは、全血の細胞性成分を分離して保持し、血清または血漿が変化せず実質的に妨害を受けずに第一のゾーンを通過することを可能にする。したがって、単数または複数の担体マトリックスの正確な組成にかかわらず、第一に考慮することは、全血試料の細胞性成分の分離、全血の細胞性成分の収集および保持、実質的に変化・希釈されていない血清または血漿の移送、ならびに場合により用いられる分離試薬組成物の包含である。

【0080】本発明の充分な利点を達成するためには、担体マトリックスは、紙のようなセルロース系物質、好ましくはろ紙；またはグラスファイバーマトリックスを含む。ろ紙およびグラスファイバーマトリックスは、共に本発明の好適な担体マトリックスに必要とされる性質を有し、さらに加えて豊富な供給、好ましい経済性および好適な等級のパラエティといった利点を有する。さらに、ろ紙およびグラスファイバーマトリックスは、第一のフィルターパッド中に場合により用いられる分離試薬組成物を懸濁し、配置することができ、また全血から細胞性成分を分離することができる。

【0081】当業者には公知のように、ろ紙およびグラスファイバーマトリックスは様々な厚さおよび多孔度のものが入手可能である。全血試料が第一の分離ゾーンと接触すること、そしてそこから実質的に無色の液体が現

れなければならないことが、本発明の試験具に必要とされるので、担体マトリックスの厚さおよび多孔度は、試験具の効率および分離法の有効性に影響する。第一のゾーンの厚さおよび多孔度は、担体マトリックスが血清または血漿から細胞性成分を分離する固有の能力と、全血が第一のゾーンに浸透して全血試料から細胞性成分が分離されるのに必要な時間に、直接関連する。したがって、多孔度の高い担体マトリックスが用いられる場合、全血の細胞性成分の効果的な分離を達成するためには、担体マトリックスの厚さは、全血と第一のゾーンとの最小有効接触時間を可能にするのに充分でなければならない。逆に、多孔度の低い担体マトリックスが用いられる場合、比較的薄い担体マトリックス層を用い得る。担体マトリックスの多孔度と厚さとの正しいバランス、および担体マトリックスに包含される場合により用いられる分離試薬組成物のタイプおよび濃度の賢明な選択は、充分に、本明細書に記載された試験具を製造する業界の当業者によって用いられる実験技術の範囲内である。

【0082】未処理の担体マトリックスを含む第一の分離ゾーンは、しばしば全血の細胞性成分を完全に分離することができない。未処理のろ紙マトリックスに全血試料を適用する場合、ろ紙を通して全血試料が浸透するにつれて観察される分離された細胞性成分の量は、ろ紙の厚さおよび多孔度と共に変化する。他の担体マトリックスについては、充分な厚さと十分に低い多孔度を有する担体マトリックスを通して血液が浸透するにつれて、全血試料からの細胞成分の部分的な分離のみが観察されている。しかしながら、担体マトリックスが薄すぎるか、または多孔度が高すぎる場合、血清または血漿からの全血の細胞と成分の分離は観察されない。しかし、担体マトリックスが好適な分離試薬組成物を包含するか、または他の方法でそれによって処理されていれば、血液試料が第一の分離ゾーンを通して浸透するにつれて、細胞性成分が効果的に分離され、担体マトリックス内に固定される。

【0083】少なくとも約1mmの厚さを有し、通常少なくとも約1.5mmの厚さを有する処理されていない担体マトリックスは、全血試料から細胞性成分を効果的に分離するのに充分である。血清または血漿から細胞性成分を除去するために、担体マトリックス中に場合により用いられる分離試薬組成物が包含されている場合、担体マトリックスの厚さは約0.2mmまで、そして好ましくは約0.3mmまで減少することができる。したがって本発明の充分な利点を達成するためには、第一のフィルターパッドは、例えば約 0.25cm ～約 1cm ×約 0.5cm ～約 2cm の大きさを有し、その中にレクチンのようなアグルチニン；トロンビンまたはトロンビン様化合物のような凝固剤；あるいはそれらの混合物を含む分離試薬組成物を包含するパッドの形態の担体マトリックスを含む。このような大きさのフィルターパッドを含む第一の分離

ゾーンは、血液がフィルターパッドの一端または上面と接触した後、十分に短い時間内に、細胞性成分を効果的に分離するのに充分な長さ、幅および厚さを有する。

【0084】第一の分離ゾーンの担体マトリックスから現われる、希釈されておらず、変化していない血清または血漿は、次いで第二の分離ゾーンに接触する。分離域の第二のゾーンは、沈殿試薬組成物を包含する担体マトリックスを含み、血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を分離する。第二のゾーンの担体マトリックスは、第一のゾーンの担体マトリックスに関して上記したのと同じ物理的および化学的性質を有する。したがって第二のゾーンの担体マトリックスは、第一のゾーンの担体マトリックスに関して上記した物質のいかなるものからでも作成し得る。第二のゾーンの担体マトリックスは、第一のゾーンの担体マトリックスと同じ物理的特性、例えば孔サイズおよびマトリックスの厚さを有し、第一のゾーンの担体マトリックスと同一であることができる。

【0085】いかなる場合においても、第二の分離ゾーンの担体マトリックスは、血清または血漿中のHDL画分の濃度に実質的に影響せずに、血清または血漿からVLDL画分およびLDL画分を分離するための沈殿試薬組成物を包含する。第二の分離ゾーンの担体マトリックス中に包含される沈殿試薬組成物は、多価金属イオン、好ましくはマグネシウムイオンのような二価金属イオン、および硫酸デキストランのような沈殿化合物を含む。沈殿試薬組成物は、血清または血漿中のLDL画分およびVLDL画分と相互作用して、第二のゾーンの担体マトリックス中に集められ保持される沈殿を形成する。担体マトリックスは、可溶性HDL画分を含有する血清または血漿が第二の分離ゾーンを実質的に妨害されずに浸透して試験具の試験域と接触することを可能にする。

【0086】本発明の試験具が、第一および第二の分離ゾーンの担体マトリックスとして上記の大きさのフィルターパッドを含む場合、約20 μ lのような針で刺した量の血液が、通常、HDLコレステロールに関する迅速で正確なアッセイを提供するのに十分な量の試料である。また、血液試料は約65%以下のヘマトクリットを含有することができ、ヘマトクリットに関するアッセイの修正は不要であることも見出された。血液試料は、滴下するかまたはピペットを用いて試験具に適用することができる。好ましくは、試験具が乾相試験ストリップの場合、試験具を新鮮な刺し傷に接触させて、毛細管作用によって試験具中に血液試料を採取する。本発明の別の特徴によれば、試験具に接触する全血試料の量は正確に測定する必要がない。しかしながら、全血の一部が試験具の試験域に接触するような過剰に大量の血液試料を試験具の分離域に載せすぎないように、注意を払うべきである。

【0087】本明細書中においてさらに詳しく説明するように、分離域の第一のゾーンは、血清または血漿から全血の細胞性成分を実質的に完全に分離するために、好ましくは、場合により用いられる分離試薬組成物を包含する担体マトリックスを含む。したがって、本発明の重要な特徴によれば、アグルチニン、凝固剤またはそれらの混合物を含む分離試薬組成物は、全血の細胞性成分が凝集するか、または第一のゾーンを通して血液試料がクロマトグラフするにつれて捕獲されるように、担体マトリックスに包含される。凝集したもしくは捕獲された細胞は、血清または血漿が分離域を前進し続けて、最終的に試験具の試験パッドと接触してそれを飽和するにつれて、第一の分離ゾーン内に固定され集められる。

【0088】本発明の以下の詳細な記載から明らかにするように、種々のレクチン、トロンビンまたはトロンビン様化合物（個別にまたは組み合わせて用いられる）は、細胞性成分を担体マトリックス中に凝集または凝固させ、希釈されていない血清または血漿が分離域の第二のゾーンに、変化されず、実質的に妨害を受けずに進行することを可能にする。その上、分離試薬組成物中に存在するレクチン、トロンビンまたはトロンビン様化合物は、過剰な溶血を促さない。したがって、赤血球は破裂せず、高度に有色の成分は色原性アッセイと干渉したり、それをマスクしない。

【0089】分離試薬組成物中に存在する好ましいアグルチニンは、レクチンである。レクチンは、細胞を凝集または集塊にし、複雑な炭水化物を沈殿することが知られているタンパク質または糖タンパク質である。レクチンは、広範な天然源から単離され、これらには種子、植物の根、樹皮、菌類、細菌、海藻、海綿、魚卵、無脊椎動物および下等脊椎動物の体液、ならびに哺乳類細胞膜などがある。本発明に用いられるレクチンは、好ましくは特定の血液グループに特異的ではなく、さもないと本発明の方法および試験具の一般的な利用が制限される。したがって、血液グループに対して特異性を示さず、本発明における使用に好適なレクチンとしては、以下のものが挙げられるが、それらに限られるものではない：Abrus precatorius(アブリン、トウアズキ)、Agaricus bisporous(マッシュルーム)、Bauhinia purpurea(キャメルズ・フット・ツリー)、Caragana arborescens(シベリアピーツリー)、Cicer arietinum(ヒヨコマメ)、Codium fragile(緑藻類)、Canavalia ensiformis(Con A、コンカナバリンA、タチナタマメ)、Datura stramonium(シロバナヨウシュチョウセンアサガオ)、Glycine max(ダイズ)、Lathyrus odoratus(スイートピー)、Lens culinaris(レンズマメ)、Limulus polyphemus(カブトガニ、Limulin)、Lycopersicon esculentum(トマト)、Maclura pomifera(オーセージオレンジ)、Mycoplasma gallisepticum、Naja mocambique mocambique(コブラ venom)、Naja naja kaouthia(コブラ venom)、Per

seuamericana (アボガド), Phaseolus coccineus (ベニバナインゲン), Phaseolus vulgaris (レッドキドニービーン), Phytolacca americana (ヨウシュヤマゴボウ), Pisum sativum (ガーデンピー), Pseudomonas aeruginosa, Psophocarpus tetragonolobus (winged bean), Ricinus communis (トウゴマ), Robinia pseudoacacia (black locust, ニセアカシア), Sambucus nigra (ニワトコ), Solanum tuberosum (ジャガイモ), Triticum vulgare (小麦麦芽), Vicia faba (ソラマメ, faba bean, broad bean), Vicia sativa, Vigna radiata (ヤエナリ), Viscum album (ヤドリギ), Wisteria floribunda (フジ), およびその他の血液型非特異性レクチン。

【0090】第一の分離ゾーンの担体マトリックス中に包含される好ましいレクチンは、コンカナバリンA (タチナタマメ) からのレクチン、Solanum tuberosum (ジャガイモ) からのレクチン、Triticum vulgare (小麦麦芽) からのレクチン、Bauhinia purpurea (キャメルズ・フット・ツリー) からのレクチンおよび Phytolacca americana (ヨウシュヤマゴボウ) からのレクチンである。本発明の充分な利点を達成するためには、第一の分離ゾーンの担体マトリックス中に、その中にジャガイモからのレクチンまたはヨウシュヤマゴボウからのレクチンを包含する。

【0091】上述のレクチンに加えて、またはその代わりに、凝固剤を、血清または血漿から全血の細胞性成分を分離するために用いることができる。具体的には、ウシ血漿からの酵素トロンビンを担体マトリックス中に包含させ、全血試料から血清または血漿をうまく分離する分離域の第一のゾーンを提供する。ウシトロンビンは、血液が第一の分離ゾーンを通して浸透するにつれて全血から赤血球が除去されるように、効果的に血液凝固を促進する。本発明の方法に有用な他のトロンビンとしては、ヒトトロンビン、ウマトロンビン、ヤギトロンビン、マウストロンビン、ラットトロンビン、ブタトロンビン、ヒツジトロンビン、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0092】さらに、上述のレクチンおよびトロンビンに加えて、またはそれらの代わりに、トロンビンと同様にふるまう凝固剤を、全血の細胞性成分からの血清または血漿の分離を効果的にするために用いる。このようなトロンビン様化合物としては、酵素アクターゼ (actase)、アグキストロドン、コントルトリックス (agkistrodon contortrix)、アンクロッド (ancrod)、アトロキシシン (atroxin)、クロタラーゼ (crotalase) およびそれらの組み合わせが挙げられるが、それらに限られるものではない。このような化合物は、作用がトロンビン様であり、血液凝固を効果的に促進する。トロンビン、レクチンまたはトロンビン様化合物を担体マトリックス上に固定化する必要はなく、全血試料からの細胞性成分の効果的な分離は、レクチン、トロンビン、トロンビン様化合物またはそれらの混合物を用いて達成しうる。

【0093】先に述べたように、本発明の試験具は、第二の分離ゾーンをも含み、それは、血清または血漿中のHDL画分に影響を与えずに、第一の分離ゾーンを出てくる血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を分離するために、沈殿試薬組成物をその中に包含する担体マトリックスを含んでいる。第二のゾーンの担体マトリックス中に包含される沈殿試薬組成物は、多価金属イオン、例えばカルシウムイオン、マグネシウムイオンまたはマンガンイオンのような二価金属イオン、および硫酸デキストラン、ヘパリンナトリウム、ホスホタングステン酸またはポリビニルスルフェートのような沈殿化合物を含む。好ましい多価金属イオンは、マグネシウムイオンのような二価金属イオンであり、好ましい沈殿化合物は硫酸デキストランである。

【0094】好適な沈殿試薬組成物は、実質的にVLDL画分およびLDL画分のみと相互作用し、HDLコレステロールのような別の可溶性血漿成分の濃度を変化させず；第二の分離ゾーンから血清または血漿によって認めうるほど抽出され、それにより試験具の試験域に移行されず；かつ、そのほかの方法によってHDLコレステロールのアッセイに干渉しない。

【0095】本発明の充分な利点を達成するためには、多価金属イオンは、典型的には塩化物塩のような水溶性塩として担体マトリックス中に包含される。その他の水溶性多価金属塩の好適な陰イオンとしては、ナイトレート、プロミド、およびアセテートのような有機陰イオンが挙げられるが、それらに限られるものではない。一般に、HDL画分に影響を与えずに血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を分離するいかなる多価金属イオンも沈殿試薬組成物に含有させうる。本発明の充分な利点を達成するためには、多価金属イオンは二価金属イオンである。好適な二価金属イオンとしては、マグネシウム、カルシウム、マンガン、コバルト、ストロンチウム、亜鉛、バリウム、銅およびそれらの混合物が挙げられるが、それらに限られるものではない。カルシウム、マグネシウムおよびマンガンは、好ましい二価金属イオンである。2を越える原子価を有するその他の好適な多価金属イオンとしては、アルミニウム、鉄およびクロムが挙げられるが、それらに限られるものではない。多価金属イオンは、約10mM〜約1,000mM、好ましくは約20mM〜約500mMの多価金属塩を含有する水性溶液から、第二の分離ゾーン中に包含される。

【0096】沈殿試薬組成物は、多価金属イオンとともに、血清または血漿中のLDL画分およびVLDL画分と相互作用する沈殿化合物をも含有する。この相互作用は、LDL画分およびVLDL画分を沈殿させるが、実質的にHDL画分に影響を与えない。沈殿物は第二の分離ゾーンの担体マトリックス中に保持されるが、一方、HDL画分は第二のゾーンを通して移動し続け、試験具の試験域と接触する。

【0097】一般に、HDL画分を分離せずに、血清または血漿からVLDL画分およびLDL画分を分離するいかなる沈殿化合物も、沈殿試薬組成物中に含有させうる。したがって、好適な沈殿化合物としては、硫酸デキストラン、ヘパリンナトリウム、ポリビニルスルフェート、ホスホタングステン酸、タングステン酸ナトリウム、アンモニウムモリブデートおよびそれらの混合物が挙げられるが、それらに限られるものではない。好ましい沈殿化合物は、硫酸デキストラン、ホスホタングステン酸またはそれらの混合物である。沈殿化合物は、0.1g/l～約20g/l、好ましくは5g/l～約15g/lの沈殿化合物を含有する水性溶液から、第二の分離ゾーン中に包含される。沈殿化合物および多価金属イオンは、一緒にして、同じ水性溶液から第二の担体マトリックス中に包含させることができ、あるいは別々の水性溶液から包含させることもできる。

【0098】したがって、要約すれば、約25単位～約250単位のレクチンまたは約50NIH単位～約150NIH単位のトロンビンもしくはトロンビン様化合物を含む水性分離試薬組成物を好適な担体マトリックス中に包含させることは、本発明の好ましい第一の分離ゾーンを提供する。その上、約10mM～約1,000mMの水溶性多価金属塩および約0.1g/l～約20g/lの沈殿化合物を含む水性沈殿試薬組成物を好適な担体マトリックス中に包含させることは、本発明の第二の分離ゾーンを提供する。第一のゾーンおよび第二のゾーンを層状配列に配列することにより、全血試料は最初に第一のゾーンと接触し、実質的にすべての細胞性成分、および実質的に全部のLDL画分およびVLDL画分が、HDL画分に影響を与えずに、血清または血漿から分離される。結果として生じる血清または血漿を、次いでHDLコレステロールに関してアッセイすることができる。

【0099】したがって、希釈、沈殿および遠心分離のような操作的工程を行う必要なしに、HDLコレステロールに関して全血試料をアッセイしうるので、より経済的な試験具が提供される。その上、実験者が潜在的に感染性の血液試料と接触することが実質的に排除されるので、本アッセイ方法は安全である。ヘマトクリット、すなわち細胞性成分が約65%以下の血液試料を、ヘマトクリットの量に関してアッセイを修正する必要なしにHDLコレステロールに関してアッセイしうるので、より正確で再現性のあるアッセイ結果もまた達成される。したがって、細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分の干渉作用が効果的に排除されるので、本発明の方法および試験具は、より感受性が高く、正確なHDLコレステロールに関するアッセイを提供する。

【0100】本発明の方法によれば、全血試料は試験具の分離域に接触し、血液試料が分離域の第一のゾーンを通過して進行するにつれて、血清または血漿から全血の細胞性成分が分離される。希釈されておらず、変化してい

ない血清または血漿は、第一のゾーンを通過して進行し、第一のゾーンと接触している分離域の第二のゾーンと接触してそれを飽和する。第二のゾーンは、希釈されていない血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を分離する。ひとつの態様においてはHDL画分を含有する血清または血漿は、第二のゾーンを通過して進行し、第二のゾーンと密接に接触している試験域と接触してそれを飽和する。別の態様においては、HDL画分を含有する血清または血漿は、第二の分離ゾーンを通過して進行し、毛細管に入る。毛細管は、血清または血漿を試験域に導き、そこで血清または血漿は収集され、HDLコレステロールに関してアッセイされる。

【0101】それぞれの態様において、試験具の試験域は、HDLコレステロールに関してアッセイするのに好適な指示試薬組成物を含有する。第一の態様、すなわち乾燥試験ストリップにおいては、指示試薬組成物は、ろ紙のような好適な基材物質中に包含される。試験域が血清または血漿で飽和され、血清または血漿が指示試薬組成物と接触した後、試験域は、血清または血漿中のHDLコレステロールに対する応答に関して、視覚的にまたは機器により検査される。

【0102】各々の態様における分離域の分離ゾーンおよび試験域の位置設定は、図1～4を参照することにより、より容易に理解される。図1は、試験具10の透視図であり、試験具10は、第二の分離ゾーン14の第一の表面と接している表面を有する第一の分離ゾーン12を含む分離域を有する。第二の分離ゾーン14は、場合により存在する第三の分離ゾーン16の表面と接している第二の表面を有する。各分離ゾーンは、適切な試薬組成物で処理されているか処理されていない、ろ紙のような別々の担体マトリックスであることができる。あるいはそうでなければ、すべての分離ゾーンは、十分な厚みを有する単一の担体マトリックス中に存在することができる。ここでは、担体マトリックスの適切な部分が、適切な試薬組成物で処理されているか、または処理されていない。分離ゾーン12、14および16は層状配列に配列されており、各ゾーンは隣接する分離ゾーンと接している。分離域は、試験域20と、毛細管18によってフルイドコミュニケーションの状態にある。第一のゾーン12は、好ましくは、アグルチニンまたは凝固剤を含有する、場合により用いられる分離試薬組成物をその中に包含している。第二のゾーン14は、多価金属イオンおよび沈殿化合物を含む沈殿試薬組成物をその中に包含している。第三のゾーン16は処理されていない。

【0103】分離域を出ていく血清または血漿は、毛細管18によって試験域20に導入される。毛細管18は、一般的に約5mils～約75mils、好ましくは約15mils～約50milsの直径を有する。試験域20は、好適な指示試薬組成物をその中に包含していることができ、あるいは指示試薬組成物は後に導入することもできる。

本明細書中においてより詳しく説明するように、HDLコレステロールの定量的測定を容易にするためには、毛細管18および試験域20は、好ましくは親水性物質、特に透明親水性物質から製造されている。

【0104】全血試料は試料口22を通過して試験具に導入され、試料の一部分が分離ゾーン12、14および存在すれば16を通過して、毛細管18と接触する。毛細管18は、血清または血漿試料を集め、次いで試料を試験域20に導入する。空気孔24は、毛細管18から試験域20への試料の通過を容易にする。

【0105】実質的に細胞を含まず、LDLを含まず、かつVLDLを含まない血清または血漿が試験域20中の指示試薬組成物と接触した後、指示試薬組成物とHDLコレステロールとの相互作用が、試験域20中に色原性変化のような検出可能な変化を生じる。試験域20は、次いで、視覚的にまたは機器により応答に関して検査され、応答の強度および度合いが血液試料中のHDLコレステロールの量と相関させられる。血液試料のヘマトクリット値に関して応答を修正する必要はない。全血試料の細胞性成分は第一の分離ゾーン12に固定され、LDL画分およびVLDL画分は第二の分離ゾーン14に固定される。したがって、全血試料のこれらの成分は、試験域20における検出可能な変化に干渉しない。

【0106】本発明のまた別の好ましい試験具の形態は、試験具40を示す図2において説明されており、ここでは、第一、第二および場合により存在する第三の分離ゾーンは、試験具40の分離域42において層状形態に配列されている。全血試料は、試料口44から試験具40に導入され、分離域42の分離ゾーンによる全血試料からの細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分の分離の後、血清または血漿は毛細管46を通過して試験域48へ移動する。空気孔50は、毛細管46を通り試験域48への血清または血漿の通過を容易にする。試験具40は、試験域48と分離域42とが異なる水平面上にあるように設計されている。したがって、図1の試験具10とは異なって、図2の毛細管46は水平に配置されておらず、分離域42から試験域48へ向かって下向きの方に配置されている。血清または血漿は毛細管46を通過して通過し、試験域48中の指示試薬組成物と接触する。血清または血漿中のHDLコレステロールの存在または濃度は、透明ハウジング52を通して検出可能な応答に関して試験域48を検査することにより測定される。

【0107】本発明の別の態様が、試験具60を示す図3に説明されている。試験具60は、第一、第二および場合により存在する第三の分離ゾーンを層状配列で含む分離域62を有する。分離域62は毛細管64と接触している。全血試料は、試料口66を通過して試験具60に導入され、分離域62と接触し浸透する。分離域62は、全血試料から細胞性成分ならびにLDL画分および

VLDL画分を分離し、血清または血漿は、分離域62を通過して進行し、毛細管64と接触してそれを満たす。毛細管64が血清または血漿で満たされた後、例えば、HDLコレステロールに関してアッセイするために必要な試薬を含有する試験ストリップを血清または血漿中に漬けることにより、あるいはHDLコレステロールに関してアッセイするために必要な試薬の溶液と血清または血漿とを接触させることにより、血清または血漿をHDLコレステロールに関してアッセイする。次いで、試薬に対する応答に関して視覚的にまたは機器により検査することにより、血液試料中のHDLコレステロールを測定する。ヘマトクリット値の変異に関する修正は必要ではない。

【0108】図4は、本発明の乾相試験ストリップ型試験具80の端面図である。試験ストリップ80は、疎水性ストリップまたは把手82を有する。試験パッド84は、ストリップまたは把手82の表面に接着固定されている。試験パッド84は、HDLコレステロールに関してアッセイするのに必要な試薬をその中に包含している。試験パッド84は、したがってHDLコレステロールと接触すると検出可能な応答を生じ、この応答は、透明材料から製造されたストリップまたは把手82を通して検査することができる。

【0109】場合により存在する第三の分離フィルター86は、ストリップまたは把手82に接着固定された試験パッド84の表面とは反対側の、試験パッド84の表面に接着固定されている。第三の分離フィルター86は、処理されていない吸水性マトリックスを含み、フィルターパッド88および90を通過する細胞性成分またはLDL画分もしくはVLDL画分の痕跡を除去するための、最終的で付加的なフィルターとして役立つ。

【0110】第二のフィルターパッド88は、試験パッド84に接着固定されている第三のフィルター86の表面とは反対側の、第三の分離フィルター86の表面に接着固定されている。第二のフィルターパッド88は、沈殿試薬組成物を包含する担体マトリックスを含み、血清または血漿からLDL画分およびVLDL画分を除去する。同様に、第一のフィルターパッド90は、分離フィルター86に接着固定されている第二のフィルターパッド88の表面とは反対側の、第二のフィルターパッド88の表面に接着固定されている。第一のフィルターパッド90は、担体マトリックスを含み、好ましくは全血試料から細胞性成分を除去するのを助けるために場合により用いられる分離試薬組成物を包含する。ストリップまたは把手82、試験パッド84、第三の分離フィルター86、第二のフィルターパッド88、および第一のフィルターパッド90からなる層状配列は、疎水性垂直支持体92によって補強される。

【0111】本発明の重要な特徴によれば、全血試料は、試験具80の第一のフィルターパッド90と最初に

接触する。全血試料は、全血試料から細胞性成分ならびにLDL画分およびVLDL画分を除去するための第一のフィルターパッド90、第二のフィルターパッド88および場合により存在する第三の分離フィルター86を通過して移動する。第三の分離フィルター86から現われる血清または血漿は、HDL画分を含有する。試験パッド84中に包含されている指示試薬組成物と接触すると、血清または血漿は、透明ストリップまたは把手82を通して検査しうる検出可能な応答を生じる。したがって、希釈、沈殿および遠心分離といった時間のかかる操作工程なしに、HDLコレステロールに関する迅速で正確なアッセイが達成される。このような操作工程の排除は、実験者誤差の可能性を排除することによりアッセイの精度を増し、実験者が潜在的に感染性の血液試料と接触する可能性を排除することによりアッセイの安全性を増す。

【0112】図1～4に説明されている試験具と同様のいくつかのその他の代替的な試験具の態様もまた考案される。例えば、より多いまたは少ない血液試料に対応させるために、分離域および試験パッドのサイズも相対的に変化させる。分離域と試験パッドとの相対的なサイズは、HDLコレステロールに関して正確にアッセイするのに必要な血液試料の量に関連している。

【0113】

【実施例】

例1 第一の分離ゾーンの担体マトリックス中への分離試薬組成物の包含

アグルチニン、凝固剤またはそれらの混合物、例えばウシトロンビン、ジャガイモからのレクチン、レクチンコンカナバリンA、ヨウシュヤマゴボウからのレクチン、またはトロンビン様酵素アクターゼを、通常のまたは等張の生理食塩溶液に溶解した。分離試薬組成物を、次いでWhatman Ltd., Maidenshead, Kent, U. K.から入手可能なWhatman CCP500ろ紙のようなろ紙、またはWhatman PD107のようなグラスファイバーマトリックスなどの担体マトリックス中に、分離試薬組成物中に担体マトリックスを浸漬するか、または担体マトリックスのシートもしくは予め裁断されたストリップ上に分離試薬組成物を噴霧することにより包含させる。分離試薬組成物を包含する担体マトリックスを、次いでオープン中、約50℃で、約20分～約40分乾燥し、本発明の第一の分離ゾーンを製造した。

【0114】例1のように担体マトリックス中に分離試薬組成物を包含させる場合、トロンビン、トロンビン様化合物またはレクチンを担体マトリックス上に固定化する必要はない。全血試料からの細胞性成分の分離のための担体マトリックス内に、レクチン、トロンビンまたはトロンビン様化合物を維持させるためには、簡便な乾燥技術で充分である。第一の分離ゾーンの担体マトリックスを、適切なサイズ、例えば0.5cm×1.0cmにした

後、図1に示される第二の分離ゾーン14または図4に示される第二のフィルターパッド88などのような第二の分離ゾーンの担体マトリックスに固定した。

【0115】例2 第二の分離ゾーンの担体マトリックス中への沈殿試薬組成物の包含

多価金属イオンの塩および沈殿化合物を水に溶解した。水性沈殿試薬組成物を、次いでWhatman Ltd., Maidenshead, Kent, U. K.から入手可能なWhatman CCP500ろ紙のようなろ紙、またはWhatman PD107のようなグラスファイバーマトリックスなどの担体マトリックス中に、沈殿試薬組成物中に担体マトリックスを浸漬するか、または担体マトリックスのシートもしくは予め裁断されたストリップ上に沈殿試薬組成物を噴霧することにより包含させる。沈殿試薬組成物を包含する担体マトリックスを、次いでオープン中、約50℃で、約20分～約40分乾燥し、本発明の第二のフィルターパッドを製造した。

【0116】本発明の方法および試験具によって達成される新規な予期せぬ結果を立証するために、図4に示されているような、透明プラスチック把手を有する乾相試験ストリップを製造した。各試験ストリップは、コレステロールに関してアッセイするために必要な試験試薬を包含するろ紙基材からなる試験パッドを有していた。各試験ストリップはまた、ジャガイモのレクチンをその中に包含するグラスファイバーマトリックスからなる第一のフィルターパッドを有していた。レクチンは、0.2mg/mlのジャガイモのレクチンを含有する水性分離試薬組成物からグラスファイバーマトリックス中に包含させた。分離試薬組成物中のレクチンの量は、グラスファイバーマトリックス1cm³当たり約25単位～約250単位のレクチンを包含させるのに充分であった。

【0117】各試験ストリップはまた、塩化マグネシウムと硫酸デキストランを含む沈殿試薬組成物をその中に包含するろ紙マトリックスからなる第二のフィルターパッドを有していた。沈殿試薬組成物は、10g/lの硫酸デキストランと500mMの塩化マグネシウムを含有する水性沈殿試薬組成物から、ろ紙マトリックス中に包含させた。各試験ストリップはまた、処理されていないろ紙からなる、場合により用いられる第三のフィルターを有していた。該試験ストリップを、65%以下のヘマトクリットを含む血液試料をHDLコレステロールに関してアッセイするのに用いた。

【0118】乾相試験ストリップに加えて、図2に示したような試験具を、全血試料中のHDLコレステロールに関してアッセイするのに用いた。第一、第二および第三の分離ゾーンは、上記のように製造したフィルターパッドであった。フィルターパッドを、直径0.9cmの円形に裁断し、3つのフィルターパッドの積層配置に配列した。血液試料は、細胞性成分を分離するための第一のフィルターパッドを最初に通過して、次いでLDL画分

およびVLDL画分を分離するための第二のフィルターパッドを通過し、最後に細胞性成分、LDL画分およびVLDL画分の最終的な痕跡を除去するための第三のフィルターパッドを通過した。HDL画分を含有する希釈されていない血清または血漿は、毛細管を通過し、集められた。血清または血漿を、次いで当業者に公知の標準的手順によって、Miles, Inc., Elkhart, INから入手可能な OPTIMATE 自動分析器を用いてHDLコレステロールに関して分析した。

【0119】全血試料から干渉性成分を分離し、試料をHDLコレステロールに関してアッセイする上記の試験具の能力を明らかにするために、既知または未知の量の

HDLコレステロールを含有する試験試料を、図2に示される本発明の試験具を用いてアッセイした。アッセイ結果を、従来の沈殿および遠心分離法によって得た結果と比較した。表Iはこれらの実験の結果を示す。したがって、表Iは、本発明の方法および試験具によって測定したHDLコレステロール濃度は、従来の、しかしより時間がかかる沈殿および遠心分離法によって実施したHDLコレステロールアッセイと等価であるということを示す。

【0120】

【表1】

表 I
HDL コレステロールに関するアッセイ法の比較

試 料	従来法による HDL コレステロール	
	総コレステロール (mg/dL)	HDL コレステロール (mg/dL)
Sigma 低-HDL 対照範囲 ¹⁾	116 - 144	22 - 32
Sigma 高-HDL 対照範囲 ¹⁾	180 - 224	57 - 69
Hektoen 試料 ²⁾		
# 1	406	56
# 2	259	35
# 3	N/A	N/A
# 4	N/A	N/A

試 料	OPTIMATEの結果 ³⁾	
	総コレステロール (mg/dL)	HDL コレステロール (mg/dL)
Sigma 低-HDL 対照範囲 ¹⁾	119.1	22.2
Sigma 高-HDL 対照範囲 ¹⁾	192.1	64.8
Hektoen 試料 ²⁾		
# 1	415.5	57.0
# 2	268.2	N/A
# 3	228.3	31.7
# 4	182.1	22.7

1) Sigma Chemical Co., St. Louis, MO から入手可能な既知の HDL コレステロール濃度の試料

2) Hektoen Institute, Chicago, ILから入手可能な未知の HDL コレステロール濃度の試料

3) 図2に示す試験具を用いたアッセイ

4) N/A は、入手不可能を意味する。

【0121】表IIは、本発明の方法および試験具により、および従来の遠心分離法により、HDL コレステロールに関してアッセイした血液試料の比較をまとめたものである。5つの例の各々において、本発明の方法および試験具によるHDL コレステロールアッセイは、従来

法によって得られたアッセイ結果と実質的に等しいものであった。

【0122】

【表2】

表Ⅱ

HDLコレステロールに関する比較アッセイ

試料	本発明の方法 ⁶⁾	従来の遠心分離法
Sigma 低-HDL対照 ¹⁾	23.0 mg/dL	22.4 mg/dL
Sigma 高-HDL対照 ¹⁾	61.1 mg/dL	65.1 mg/dL
MCC (低) ⁷⁾	30.8 mg/dL	21.3 mg/dL
MCC (高) ⁷⁾	111.3 mg/dL	113.2 mg/dL
ヒト (未知) ⁸⁾	25.1 mg/dL	24.9 mg/dL

6) 処理されていないグラスファイバーの付加的な第三のフィルターを有する図2の試験具を用いた本発明の方法

7) Gilford から入手可能な多成分キャリブレーター

8) 未知の量のHDLコレステロールを含有するヒト全血試料

【0123】図5～図8は、本発明の試験具および方法の、HDLコレステロールに関するアッセイにおいて全血試料から干渉性の細胞性成分、LDL画分およびVLDL画分を分離する能力をさらに示す。図5～図8は、電気泳動データのプロットであり、本発明の方法および試験具によって全血試料からLDL画分およびVLDL画分が除去されたことを示す。ろ過された血清または血漿の薄い淡黄色によって立証されるように、ろ過された血清または血漿は、実質的に細胞性成分を含まない。

【0124】特に、図5は、付加的なアグルチニンを含む第一の分離ゾーンによって全血の細胞性成分から分離された血清または血漿のリポタンパク質スキャンからの電気泳動データのプロットである。図5は、血清または血漿が、VLDL画分、LDL画分およびHDL画分を含有することを示す。さらに、図8は、血清または血漿からの細胞性成分の除去を容易にするために第一の分離ゾーン中にジャガイモからのレクチン (*S. tuberosum* のレクチン) を包含させることは、血清または血漿中に存在する3つの可溶性リポタンパク質画分のいずれにも影響しないことを示す。したがって、第一の分離ゾーン中に場合によりレクチンを包含させることは、全血試料中のHDLコレステロールに関する後のアッセイに悪影響を与えない。

【0125】図6は、従来の沈殿および遠心分離法によってLDL画分およびVLDL画分を除去した血清または血漿試料のリポタンパク質スキャンからの電気泳動データのプロットである。図6は、LDL画分およびVLDL画分によるバンドが欠如していることを示す。図7は、図2に示されるような本発明の試験具から出てきた後に集められた血清または血漿試料のリポタンパク質スキャンからの電気泳動データのプロットである。図7のプロットもまた、LDL画分およびVLDL画分による

バンドが欠如していることを示す。図7のプロットは図6のプロットと実質的に同一であり、本発明の方法および試験具が血清または血漿から実質的にすべてのLDL画分およびVLDL画分を分離することを示す。

【0126】本発明の別の重要な特徴によれば、約65%以下のヘマトクリットを含む全血試料中のHDLコレステロールの濃度は、本発明の方法および試験具を用いることにより、修正なしで正確に測定されうることが示されている。図5および図8に示されているように、好ましくは場合により用いられるアグルチニンまたは凝固剤を含有する第一の分離ゾーンの担体マトリックスは、血清または血漿中の可溶性リポタンパク質の濃度に悪影響を与えることなしに、血清または血漿から細胞性成分を効果的に分離した。したがって、本発明は、試験試料中のヘマトクリットの量に依存せず、より再現性のあるアッセイ結果を与える、HDLコレステロールに関するアッセイの経済的な試験具および方法を提供する。本発明の試験具および方法は、アッセイ干渉物の効果的な除去、およびその後の現在利用可能な機器によるまたは視覚的な検出技術によるHDLコレステロールに対するアッセイ応答の、迅速で、安全で、経済的かつ正確な検出を立証する。

【0127】本発明のさらに別の重要な特徴によれば、試験具の第一の分離ゾーンは、第一の分離ゾーンがレクチン、トロンビン、トロンビン様化合物またはそれらの組み合わせを含有するかぎりにおいて、抗凝固剤の存在下でさえも血清または血漿から全血の細胞性成分を効果的に分離した。具体的には、ヘパリンまたはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) のような抗凝固剤を含有する全血は、本発明の分離方法および試験具にかけることができる。したがって、新鮮な血液試料を抗凝固剤で処理し、次いで後日に本発明の方法および試験具によってH

D L コレステロールに関してアッセイすることができる。

【0128】血清または血漿からの赤血球細胞、L D L 画分およびV L D L 画分の予期せぬほどに効率的な分離に加えて、本発明の方法および試験具は、十分に多量でアッセイ可能な量の血清または血漿が試験具の試験域に達することを可能にする。さらに、血清または血漿は、実質的に変化していない形態で試験具の試験域に達する。一般に、乾相試験ストリップの場合においては、試験パッドが血清または血漿で飽和される場合に正しい量の血清または血漿が試験域に達している。これは、試験パッドの血清または血漿による飽和を確かにするために十分に多量の全血試料を用いることにより、あるいは好ましくは試験域が血清または血漿で飽和されるように分離域の分離ゾーンと試験パッドとの相対的なサイズを調整することにより、達成される。全血試料の容量を正確に測る必要はない。この方法は、実質的に一定量の血清または血漿が試験パッドに達することを可能にし、可溶性成分のより正確な測定にする。血液試料のサイズ、フィルターパッドのサイズ、試験パッドのサイズおよび試験域に包含される指示試薬組成物の量といった変数は、診断試験ストリップを設計する領域の当業者には容易に決定することができる。

【0129】全血の血清または血漿からの細胞成分、L D L 画分およびV L D L 画分の迅速で効率的な分離、ならびに変化していない血清または血漿の試験域への実質的に妨害を受けない移動に加えて、本発明の方法および試験具は、全血、血清または血漿の希釈なしに、ならびに高度に有色な赤血球細胞、L D L 画分およびV L D L 画分からの干渉なしに、H D L コレステロールの定量的アッセイを可能にする。希釈されていない血清または血漿を試験することは、操作的工程をなくし、より重要なことには、実験者誤差の可能性および実験者が潜在的に感染性の試験試料と接触することを排除する。

【0130】好適な色原性試薬組成物は、試験具の試験域中に充分な量で包含され、新たに分離された希釈されていない血清または血漿中のH D L コレステロールとの検出可能な相互作用を可能にする。色原性反応の範囲、およびしたがってH D L コレステロールの定量的量は、次いで当業界において公知の視覚的なまたは機器による色原性検出技術によって測定される。したがって、本発明の方法および試験具は、より経済的であり；より再現性のある結果を生じ；アッセイが試験試料のヘマトクリット値に依存せず；実験者が操作的工程を実施する必要がなく、潜在的な実験者誤差が回避され；実験者が血液試料との物理的接触を回避するので、従来の方法および試験具よりもかなりの利点を立証する。

【0131】したがって、H D L コレステロールに関する少容量の全血の正確で信頼できるアッセイは、全血の細胞性成分によるまたは可溶性L D L 画分もしくはV L

D L 画分による干渉なしに、数分以内に達成される。本アッセイは、希釈または遠心分離のような付加的な操作的工程が不必要なので、簡便で経済的で安全である。さらに、本発明の試験具および方法は、実験者が潜在的に感染性の全血試料との接触から効果的に保護されるので、安全である。乾相試験ストリップの場合には、全血試料全体、すなわち分離域において分離された成分および試験パッド中の血清または血漿の両方は、試験具の要素に保持される。したがって、全血試料と人間との接触は実質的に除外される。このような特徴は、当業界において新規である。なぜならば、血清または血漿を試験するための従来の方法および試験具は、試験具から分離された成分を拭き取るかまたはすすぎ落とす際に、または遠心分離および関連の物理的分離法において血液を移したり希釈する際に、ヒトが血液試料と接触する可能性を生じるからである。

【0132】例3および4は、H D L コレステロールに関してアッセイするための本発明の方法および試験具によって実施されたアッセイを立証する。

【0133】

例3 血清または血漿中のH D L コレステロールの測定 希釈されていない全血試料を、図2に示されるような試験具によってH D L コレステロールに関してアッセイした。同様に、希釈されていない全血試料を、図1および図3に示されるような試験具によってH D L コレステロールに関してアッセイすることができる。針で刺した量程度の全血試料を試験具の試料口に導入し、全血試料を、好ましくは場合により用いられるレクチンを含有する分離試薬組成物を包含する担体マトリックスからなる第一のフィルターパッドに吸収させる。血液試料は、第一のフィルターパッドを通してクロマトグラフし、それにより血清または血漿から全血の細胞性成分が分離される。血液試料は、第一のフィルターパッドをクロマトグラフした後に、試料中の血清または血漿の量が第一のフィルターパッドに接している第二のフィルターパッドを完全に湿らせるかまたは飽和するのに足りるように、充分な量であった。第二のフィルターパッドは、多価金属イオン、好ましくは二価金属イオン、および沈殿化合物を含む沈殿試薬組成物を包含する担体マトリックスからなっていた。血清または血漿は第二のフィルターパッドを通してクロマトグラフし、それにより可溶性L D L 画分およびV L D L 画分が血清または血漿から分離される。血清または血漿試料は、第二のフィルターパッドをクロマトグラフした後に、血清または血漿の量が毛細管を通して移動し試験具の試験域に集められるのに足りるように、充分な量であった。H D L コレステロールに関してアッセイするのに必要な試薬を含み、先に試験具の試験域中に包含されている試薬組成物は、血清または血漿中のH D L コレステロールと相互作用し、血清または血漿中のH D L コレステロール含量と定量的に相関する。

測定可能な色原性変化を生じる。

【0134】試験域中の色原性変化を、視覚的に、例えば標準化色チャートとの比較により、あるいは機器により、例えば反射率測定機器により、測定した。本発明の方法は、全血試料の不溶性細胞成分からの、または血清または血漿中の可溶性LDL画分もしくはVLDL画分からの干渉なしに、希釈されていない血清または血漿試料中のHDLコレステロールの濃度に対する応答を提供する。さらに、本アッセイは全血試料のヘマトクリット値に依存しない。

【0135】例4 乾相試験ストリップによる血清または血漿中のHDLコレステロールの測定
希釈されていない全血試料を、図4に示されるような乾相試験具を用いてHDLコレステロール含量に対してアッセイした。各試験具は、ポリアミド、例えばPall Cor*

0.2Mリン酸緩衝液 (pH6.0)
グリセロール
タウロコール酸ナトリウム
ペルオキシダーゼ
コレステロールエステラーゼ
コレステロールオキシダーゼ

ポリビニルピロリドン (PVP K-60、GAF Chemicals Corp., Wayne, NJから入手可能) (4.5%w/w)

【0137】第二の含浸の後、基材物質を、再び熱気対流オープン中、約50℃で、約5分～約10分間乾燥し、液体試験試料中のコレステロールの量を測定するための試験パッドを製造した。

【0138】各試験具は、レクチンを含む分離試薬組成物を包含する担体マトリックスからなる第一のフィルターパッド；ならびに二価金属イオンおよび沈殿化合物を含む沈殿試薬組成物を包含する担体マトリックスからなる第二のフィルターパッドをも有していた。第一および第二のフィルターパッドの担体マトリックスは、Whatman Ltd.またはMillipore Corporation から入手可能な、約1μ～約6μの孔サイズを有するグラスファイバーマトリックスであった。第一のフィルターパッドを、約0.05% (w/w)のヨウシュヤマゴボウからのレクチンを含む水性分離試薬組成物中に浸漬した。第二のフィルターパッドは、約500mMの塩化マグネシウムおよび約10g/lの硫酸デキストランを含む水性沈殿試薬組成物中に浸漬した。

【0139】分離試薬組成物と沈殿試薬組成物をそれぞれのグラスファイバーマトリックス中に包含させたのち、それぞれの含浸したグラスファイバーマトリックスをガラス棒でひっかいて、過剰な分離試薬組成物または沈殿試薬組成物を除去した。含浸したグラスファイバーマトリックスを、次いで熱気対流オープン中、約50℃で、約30分間乾燥し、本発明の第一のフィルターパッドおよび第二のフィルターパッドを製造した。

【0140】試験パッドならびに第一および第二のフィ

*porationから入手可能で3μの孔サイズを有するBIODYNE Bのようなナイロン、またはMillipore Corporation、Bedford, MA から入手可能で0.65μの孔サイズを有するDURAPOREのようなフッ化ポリビニリデンの基材物質を含む試験パッドを有していた。試験パッドの基材物質は、約1.5% (w/w)のテトラメチルベンジジンヒドロクロリド指示色素、および約0.4% (w/w)のポリ(メチルビニルエーテル/マレイン酸無水物) (GAF Chemicals Corp., Wayne, NJ から入手可能なGANTREZ AN-139)を含有する水性溶液中に基材物質を浸漬することにより、試験組成物をまず包含させた。含浸した基材物質を、次いで熱気対流オープン中、約50℃で、約5分～約10分間乾燥した。含浸した基材物質を、次いで以下のものを含有する第二の水性溶液中に浸漬した：

【0136】

67.9% (w/w)

6.4% (w/w)

0.7% (w/w)

500U/ml

500U/ml

250U/ml

23.8% (w/w)

ルターパッドを、次いで図4に示されるように透明な把手の上に層状配列で配置した。得られた試験パッドを、HDLコレステロールに関して全血試料をアッセイするために用いた。各アッセイは、約30μlの全血試料および本発明の試験具1個を必要とした。

【0141】アッセイは、最初に身体のどこかに小さい刺し傷を作ることにより実施した。試験具の第一のフィルターパッドを、次いで傷から出る全血に接触させた。充分な量の全血が第一のフィルターパッドを飽和した後に、試験具を傷から除去した。全血試料を、次いで過剰な全血試料が試験具のいかなる外表面にもたまって留まらないように、第一および第二のフィルターパッド中に十分に吸収させた。充分な時間の後、例えば約1～2分後に試験パッドを、反射率測定機、すなわちMiles, Inc., Elkhart, INから入手可能なOPTIMATE機器で、透明な把手を通して検査した。あるいはそうでなければ、試験具を視覚的に、例えば標準化色チャートと試験パッドを視覚的に比較することにより検査した。試験パッドを応答に関して試験した後、試験パッドを廃棄した。本発明の方法および試験具は、実験者が潜在的に感染性の全血試料を含む表面と接触することをなくす。

【0142】HDL画分を含む血清または血漿と、試験パッド中に包含される指示試薬組成物との相互作用から生ずる色遷移を、反射率光度計によって検査した。一般に、未知の濃度のHDLコレステロールの血液試料と試験パッドとの接触によって生ずる色遷移の、標準化HDLコレステロール濃度と試験パッドとの接触によ

て生ずる色遷移との比較は、血液試料中のHDLコレステロール濃度に関する定量的アッセイを与える。次いで、用量応答プロットをグラフ化し、アッセイの色遷移の強度が、試験試料中のHDLコレステロール濃度に直接比例して変化したことを示した。

【0143】本明細書の開示は、好ましい態様によってのみなされたものであり、本明細書中において特許請求された発明の精神および範囲を逸脱することなしに、構築物、組合せおよび部品の配列の詳細において多数の変更が可能であることが理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の試験具の一態様の透視図。

【図2】本発明の試験具の一態様の透視図。

【図3】本発明の試験具の一態様の透視図。

【図4】本発明の乾相試験ストリップ型試験具の端面図。

【図5】本発明の第一の分離ゾーンによって細胞性成分を除去された血清または血漿のリポタンパク質スキャンの電気泳動データのプロット。

【図6】従来法によってLDL画分およびVLDL画分を除去された血清または血漿のリポタンパク質スキャンの電気泳動データのプロット。

* 【図7】図2の試験具によって分離された血清または血漿のリポタンパク質スキャンの電気泳動データのプロット。

【図8】レクチンを含む第一の分離ゾーンによって細胞性成分を除去された血清または血漿のリポタンパク質スキャンの電気泳動データのプロット。

【符号の説明】

10、40、60、80 試験具

12 第一の分離ゾーン

14 第二の分離ゾーン

16 第三の分離ゾーン

18、46、64 毛細管

20、48 試験域

22、44、66 試料口

24、50 空気孔

42、62 分離域

82 ストリップまたは把手

84 試験パッド

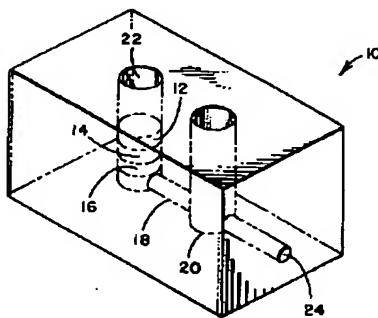
86 第三の分離フィルター

88 第二のフィルターパッド

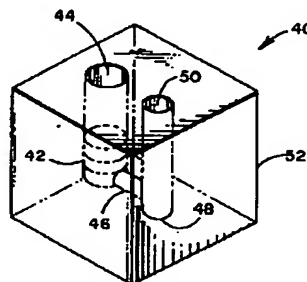
90 第一のフィルターパッド

* 92 疎水性垂直支持体

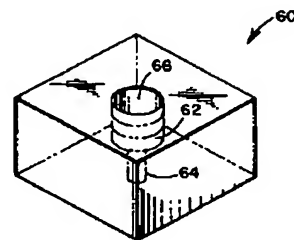
【図1】



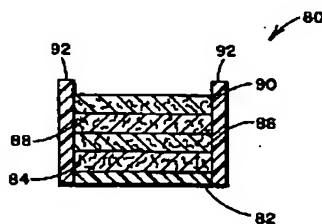
【図2】



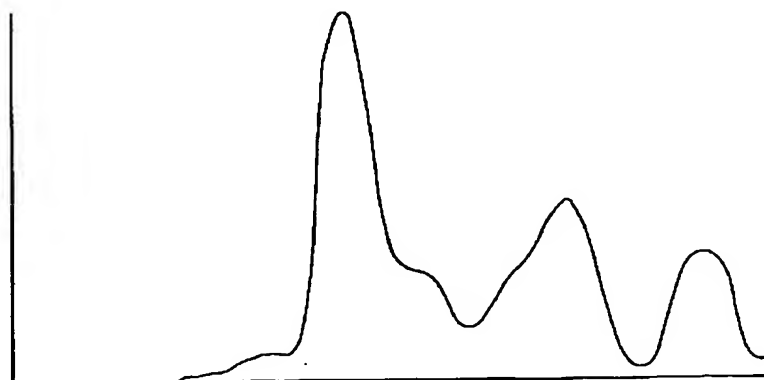
【図3】



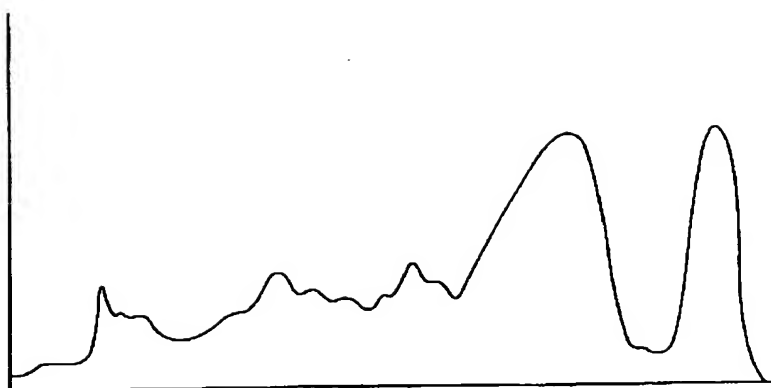
【図4】



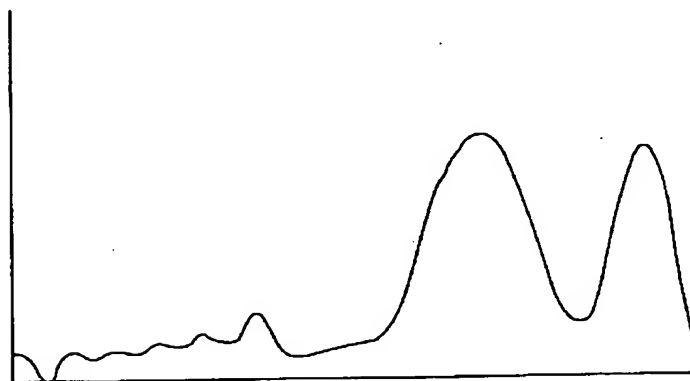
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】

